

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Altération de l'expression rénale de la néphrine et de la podocine chez le
rat diabétique**

Par
Nicolas Giorgi

Département de Pathologie et Biologie cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître en science (M.Sc)
En Biologie cellulaire

Décembre, 2006

© Nicolas Giorgi, 2006



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Altération de l'expression rénale de la néphrine et de la podocine chez le
rat diabétique**

Présenté par :

Nicolas Giorgi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Louis Gaboury
Président rapporteur

Dr. Moïse Bendayan
Directeur de recherche

Dr. Guy Boileau
Membre du jury

SOMMAIRE

Le diabète est une maladie métabolique dégénérative très répandue en Amérique du nord. Il se caractérise entre autre par des niveaux élevés de glucose dans le sang et s'accompagne d'une néphropathie manifestant une protéinurie et une glycosurie. Cette néphropathie a été considérée jusqu'à présent comme étant la conséquence de l'épaississement de la membrane basale dans le glomérule.

Le rein filtre le sang au niveau de son unité fonctionnelle, le glomérule. Le sang y pénètre par l'artériole afférente et en ressort par l'artériole efférente. Plusieurs molécules y sont filtrées et certaines, réabsorbées plus tard. Ces substances doivent traverser trois structures dans le glomérule: l'endothélium, la membrane basale et les fentes de filtration. Il a été démontré que dans diverses affections, la protéinurie est due à un manque total ou partiel de Podocine et de Néphrine, protéines qui composent les fentes de filtration. Nous avons donc décidé d'étudier ces deux protéines afin d'évaluer leur participation dans le diabète.

Pour nos recherches, nous avons utilisé des rats que nous avons classés en quatre groupes : les groupes contrôles de trois mois et de douze mois, et les groupes diabétiques de trois mois et de douze mois. Les lésions diabétiques ont été induites par l'administration de streptozotocine. Par ailleurs, pour l'étude des deux protéines, nous avons utilisé des techniques d'immunocytochimie et d'immunobuvardage afin de mesurer l'altération de leurs niveaux d'expression dans les fentes de filtration.

En immunocytochimie, nous avons observé une diminution notable du marquage sur la membrane des pédicelles pour la Néphrine et la Podocine chez les rats diabétiques et chez les rats contrôles de douze mois par rapport aux rats contrôles de trois mois. En revanche, les résultats obtenus des homogénats de glomérules en immunobuvardage ne nous/ ont pas permis de confirmer une telle diminution des niveaux d'expression des protéines, ce qui suggère qu'elles s'accumulent dans le réticulum endoplasmique. Ceci pourrait être le résultat d'un défaut des protéines ou d'une carence au niveau du transport. Les résultats de notre recherche semblent indiquer que, outre l'épaississement de la membrane basale, la perte de Néphrine et de Podocine dans les fentes de filtration altère la filtration glomérulaire dans le diabète. Notre étude montre par ailleurs que cette perte de protéines s'observe aussi lors du vieillissement.

Mots clés : Néphrine, Podocine, Néphropathie, Diabète, Filtration glomérulaire

SYNOPSIS

Diabetes is a degenerative metabolic disease widespread in North America. It is characterized by high glucose levels in the blood and presents itself with a nephropathy associated with proteinuria and glycosuria. This nephropathy was considered until now as being a consequence of the thickening of the basement membrane in the glomerulus.

The kidney filters blood through the glomerulus, the functional unit of the organ. Blood enters the glomerulus by the afferent artery and leaves it by the efferent artery. During filtration several molecules are eliminated, some of which are reabsorbed later on. They must cross three structures to reach the urinary space: the endothelium, the basement membrane and the slit-diaphragms. It has been shown in several renal diseases that the proteinuria is due to a total or partial lack of Podocin and Nephrin, proteins forming the slit diaphragm (space located between two podocyte projections). We thus decided to study these two proteins in order to evaluate their involvement in diabetes.

For this purpose, we used rats which we divided into four groups: controls at three and twelve month old, diabetics at three and twelve month old. The diabetic lesions in these rats was caused by streptozotocine injection. In addition, in order to measure the altered levels of Nephrin and Podocin's expression levels in the slits of filtration, we used immunocytochemistry and western blot techniques.

Using electron microscopy, we observed a notable reduction in labeling on the foot process' membrane for Nephrin and Podocin, in diabetic and twelve month old control rats compared to their three month old counterparts. On the other hand, the results obtained by western blot did not allow us to confirm such a reduction in protein levels, which suggests an accumulation of these proteins in the endoplasmic reticulum. This could be the result of a defect of the proteins itself or a deficiency of its transport to the membrane.

The results of our research indicate that, in addition to the thickening of the basement membrane, the loss of Nephrin and Podocin in the slit diaphragms alter glomerular filtration in diabetes. Our study also shows that this protein loss is also noticeable with aging.

Key words: Nephrin, Podocin, Nephropathy, Diabetes, Glomerular filtration

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SYNOPSIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
RÉSULTATS.....	31
DISCUSSION.....	73
BIBLIOGRAPHIE.....	85
REMERCIEMENTS.....	xi

LISTE DES TABLEAUX

	Page	
Tableau I	44	Pourcentage relatif pour chaque compartiment étudié du décompte total de particules d'or pour les contrôles à trois mois (néphrine C et N-terminal et podocine).
Tableau II	48	Morphométrie du marquage pour la néphrine dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles (anticorps dirigé contre la partie intracellulaire de la néphrine) pour les quatre groupes étudiés (particules d'or par μm .)
Tableau III	54	Morphométrie du marquage pour la néphrine dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles (anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de la néphrine) pour les quatre groupes étudiés (particules d'or par μm .)
Tableau IV	62	Morphométrie du marquage pour la podocine dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles pour les quatre groupes étudiés (particules d'or par μm .)

LISTE DES FIGURES

	page	
Schéma 1	17	Anatomie macroscopique interne du rein.
Schéma 2	19	Anatomie macroscopique du néphron
Schéma 3	21	Les podocytes : anatomie et localisation.
Schéma 4	23	Les canaux ioniques au niveau des différents tubules du rein.
Figure 1	40	Marquage en immunocytochimie (particules d'or de 5 nm) de la néphrine au niveau d'un glomérule (agrandissement : 68 250 x.)
Figure 2	42	Marquage en immunocytochimie (particules d'or de 5 nm) de la néphrine au niveau d'un glomérule (agrandissement : 155 000 x)
Figure 3	46	Graphique montrant les pourcentages relatifs à chaque compartiment étudié du marquage total pour les anticorps de néphrine et podocine.
Figure 4	50	Graphique montrant les différences du marquage de la néphrine (dirigé contre la partie intracellulaire de la protéine) dans les différents compartiments pour les quatre groupes étudiés.
Figure 5	52	Marquage en immunocytochimie du deuxième anticorps anti-néphrine (dirigé à la partie extracellulaire de la protéine) (particules d'or de 5 nm) (agrandissement : 139 860 x).

Figure 6 56 Graphique montrant les différences du marquage de la néphrine (dirigé contre la partie extracellulaire de la protéine) dans les différents compartiments pour les quatre groupes étudiés.

Figure 7 58 Marquage en immunocytochimie (particules d'or de 5 nm) de la podocine dans un glomérule (agrandissement : 33 600x).

Figure 8 60 Marquage en immunocytochimie (particules d'or de 5 nm) de la podocine dans un glomérule (agrandissement : 136 500 x).

Figure 9 64 Graphique montrant les différences du marquage de la podocine dans les différents compartiments pour les quatre groupes étudiés.

Figure 10 66 Étude en immunobuvardage de la néphrine pour les trois groupes étudiés. Présence de deux bandes (180 et 190 kDa).

Figure 11 68 Étude densitométrique des résultats obtenus par immunobuvardage de la néphrine.

Figure 12 70 Étude en immunobuvardage de la podocine pour les trois groupes étudiés. Présence de deux bandes (45 et 190 kDa).

Figure 13 72 Étude densitométrique des résultats obtenus par immunobuvardage de la podocine.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AE1	échangeur anionique
ATP	Adénosine triphosphate
°C	degré Celsius
CD2AP	display complex 2 adapter protein
Cl ⁻	chlore
cm	centimètre
CO ₂	dioxyde de carbone
Ctr	contrôle
Dbt	diabétique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
Fig.	Figure
g	gramme
H ⁺	ion d'hydrogène
HCL	acide chlorhydrique
HCO ₃ ⁻	bicarbonate
H ₂ O	eau
IgG	immunoglobuline G
kDa	kilodalton
Kg	kilogramme
L	litre
M	mole
MBG	membrane basale glomérulaire

NBC 1	cotransporteur sodium – bicarbonate
NHE3	échangeur proton – sodium
mM	millimolaire
n	nombre de série de donnés
nm	nanomètre
PAS	réactif périodique de la base de Schiff
PBS	tampon phosphate salin
pH	concentration en ions d'hydrogène
r.p.m.	tours par minute
Str-Stz	streptozotocine
TBST	solution tampon saline tris tween-20
TGF- β	transforming growth factor
μm	micromètre

Introduction

Introduction :**L'anatomie du rein :**

L'appareil urinaire est composé de deux reins qui filtrent le sang et produisent l'urine qui est par la suite conduite par les uretères jusqu'à la vessie. Cette dernière l'accumule entre les mictions et l'évacue via l'urètre.

Le rein mesure en moyenne chez l'homme, 12 cm de long, 6 cm de large et 3 cm d'épaisseur. Chez le rat ces mesures sont respectivement 2cm, 1cm et 0.8 cm. En moyenne, le rein adulte pèse environ 140 g chez l'homme et 3g chez le rat. Il est maintenu dans le rétropéritoine grâce à une capsule adipeuse qui le relie au fascia rénal, enveloppe fibreuse qui entoure le rein. Cette dernière est en fait, un repli du péritoine. En ce sens, l'emplacement du rein est particulier dans la mesure où contrairement à la majorité des organes abdominaux qui se trouvent à l'intérieur du péritoine, le rein est lui, rétropéritonéal.

La loge rénale est limitée intérieurement par le muscle psoas, postérieurement par le muscle quadratus lumborum et extérieurement par le muscle obliquus externus abdominis et les 11ème et 12ème côtes. Par ailleurs, le rein droit est circonscrit antérieurement par le péritoine et le foie, tandis que le rein gauche est limité lui, par le péritoine et l'angle splénique du côlon transverse. Finalement, la glande surrénale vient coiffer la partie supérieure du rein.

Les reins sont situés d'un côté et de l'autre de l'aorte. Ils sont irrigués par l'artère rénale qui émerge perpendiculairement de l'aorte et pénètre les reins entre leurs pôles supérieurs et inférieurs. En outre, la veine rénale qui longe parallèlement l'artère rénale se déverse dans la veine cave inférieure.

Le rein est constitué d'une partie externe, le cortex et d'une partie profonde, la médulla. Cette dernière est divisée en pyramides rénales, les pyramides de Malpighi, qui convergent vers la partie médiane du rein. Leurs sommets, appelés papilles, se jettent d'abord dans les calices rénaux, puis dans le bassinet (**schéma 1**). Le cortex s'insère entre les pyramides formant des interdigitations: les colonnes de Bertin. La partie plus externe du cortex est formée premièrement par des pyramides, appelées pyramides de Ferrein, qui s'étendent des pyramides de Malpighi jusqu'aux alentours de la périphérie du rein qu'elles n'arrivent pas à atteindre, et deuxièmement par le labyrinthe, parenchyme situé entre les pyramides de Ferrein. Finalement, le rein se subdivise en plusieurs lobes, chacun composé de labyrinthes de pyramides de Malpighi et de Ferrein. .

L'histologie du néphron:

Le néphron:

Le néphron est composé de deux éléments qui participent à la formation de l'urine : le glomérule, responsable de la filtration, et les tubules rénaux qui président la réabsorption.

Ces derniers sont en outre divisés en quatre compartiments: le tubule proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal, et le tubule collecteur (**schéma 2**).

Le tubule proximal exerce une fonction de réabsorption. En effet, il est formé par des cellules épithéliales cuboïdales munies de microvillosités qui augmentent la superficie d'absorption. Ces cellules possèdent de plus, un grand nombre de mitochondries, et leurs membranes à la base sont invaginées. Par ailleurs, elles ont le long de leurs membranes basolatérales, une ATPase sodium-potassium qui produit l'énergie nécessaire à la réabsorption du glucose et des acides aminés. Cette réabsorption est effectuée par des transporteurs membranaires tels que

l'échangeur sodium-protons et le cotransporteur sodium-glucose situés entre autres, sur la membrane apicale. Le noyau des cellules épithéliales occupe finalement la portion apicale de la cellule. L'épithélium du tubule proximal n'étant pas un épithélium «serré», il permet à l'eau et aux petites molécules de passer entre les cellules **(1 et 2)**. Ce tissu est en somme responsable de la majorité de la réabsorption qui se fait soit par transport cellulaire, soit par passage paracellulaire comme le montrent d'ailleurs ses caractéristiques histologiques.

L'anse de Henlé est divisée, à son tour, en deux parties: la partie descendante et la partie ascendante. Cette dernière est également constituée de deux parties : la portion grêle et la portion épaisse. En ce qui a trait aux cellules de la partie descendante, elles sont tout d'abord aplaties, et contrairement aux cellules du tubule proximal, elles ne possèdent pas de bordure en brosse. L'anse est donc tapissée par une couche simple de cellules pavimenteuses. Son épithélium est lâche **(3)**, permettant ainsi le passage de l'eau tout en restant imperméable au sodium et au chlore. En revanche, la portion épaisse de l'anse de Henlé possède un épithélium serré, formé de cellules cuboïdales **(4)** qui empêchent la réabsorption de l'eau. En effet, cette portion réabsorbe activement le sodium et le chlore tout en étant imperméable à l'eau.

Le tubule distal ne possède pas de bordure en brosse, mais quelques cellules possèdent des microvillosités **(5)**. Les cellules qui le composent sont plus petites et possèdent un noyau rond ou ovale placé à proximité de la membrane luminale **(5)**. Elles possèdent en outre un grand nombre de mitochondries. L'épithélium, à ce niveau, est serré **(6)**, ce qui permet l'établissement d'un gradient de concentration. Il importe de souligner toutefois que la résistance transépithéliale y est moins élevée que dans les tubules collecteurs. Il en résulte ainsi une réabsorption active d'ions qui maintient l'eau dans l'espace urinaire. Finalement, le tubule collecteur tapissé par un épithélium cuboïdal qui entoure une lumière large est constitué de cellules principales et intercalaires.

Le glomérule:

Le glomérule est la structure responsable de la filtration du sang. On observe au cœur de celui-ci, un microsystème circulatoire formé d'une artériole afférente et d'une artériole efférente. Le tout est entouré d'abord par une membrane basale, puis par des cellules épithéliales appelées podocytes. Le glomérule est englobé finalement par la capsule de Bowman. Cette capsule est composée d'un feuillet externe, ou pariétal, et d'un feuillet interne, ou viscéral, qui contiennent les podocytes. Tous deux sont par ailleurs tapissés par un épithélium aplati. On retrouve entre ces deux feuillets, l'espace de Bowman dans lequel se déverse le filtrat après avoir traversé les fentes de filtration.

En ce qui concerne les podocytes, ce sont les cellules épithéliales du glomérule qui forment des interdigitations posées à la surface de la membrane basale, et qui se ramifient ensuite pour donner des interdigitations de deuxième ordre, les pédicelles, riches en actine (**schéma 3**). Les pédicelles de différents podocytes adjacents s'entrecroisent entre elles (**7**), créant ainsi un espace appelé la fente de filtration (**8, 9, 10 et 11**). Le podocyte possède de plus, une grande activité métabolique, comme en témoigne son appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, tous deux largement développés (**12**). Son cytoplasme est riche en microtubules et en filaments (**12 et 13**). De plus, nous pouvons également identifier le long de son versant basolatéral, un grand nombre de vésicules et de corps lysosomaux.

La membrane basale est une matrice extracellulaire qui mesure entre 300 et 350 nm d'épaisseur (135nm chez le rat). Elle fournit un support structurel à la paroi du capillaire et aux pédicelles. Elle est formée notamment par le collagène type IV, qui génère la force de traction de la membrane, par les protéoglycanes, la laminine et le nidogen. Elle est en outre particulièrement riche en glycosaminoglycanes et en héparan sulfate, tous deux chargés négativement.

L'endothélium est une mince couche d'épithélium spécialisé et polarisé. Sa face apicale est au contact du sang et sa face basale se situe sur la membrane basale. Cet endothélium fenêtré, est muni de pores qui peuvent atteindre jusqu'à 100nm de diamètre, et est formé d'une seule couche de cellules pavimenteuses. Ces cellules possèdent un vaste réseau de microtubules, de filaments intermédiaires et de filaments minces.

La physiologie du rein:

Le rein est un organe essentiel pour le maintien du milieu interne. En ce sens, il exerce quatre fonctions principales: il maintient la pression artérielle et le pH sanguin; il élimine les déchets filtrés du sang, et veille enfin à l'équilibre hydroélectrique. Il réalise tous ces rôles grâce à son unité fonctionnelle, le néphron qui, comme nous l'avons vu plus haut, naît dans le cortex au niveau du glomérule, et se termine avec le tubule collecteur dans la médulla.

Le pH du sang est maintenu constant à 7.3 – 7.4. Le corps possède deux systèmes de régulation, le poumon et le rein, qui agissent en parallèle afin d'éviter des variations excessives du pH, acidose ou alcalose. Le premier contrôle le pH par la variation du rythme respiratoire. En effet, l'hyperventilation élimine davantage de CO_2 , déplaçant ainsi l'équilibre de la réaction $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ = \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ vers la droite. Ceci entraîne l'élimination de protons et rend possible le contrôle de l'acidose de façon aiguë. Le rein quant à lui, veille également sur le pH grâce à la présence de divers transporteurs, tels que le NHE3 (échangeur Na^+/H^+) situé dans le tube proximal et dans la partie ascendante de la boucle de Henlé (14), le NBC1 (cotransporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) au niveau du tube proximal (15), le AE1 (échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) des cellules intercalaires β du tubule collecteur (16 et 17) et finalement, la pompe H^+ ATPase, au niveau des cellules intercalaires α du tubule collecteur. Ces transporteurs permettent l'élimination de H^+ par transport actif. (schéma 4)

L'équilibre hydroélectrique s'effectue par étapes tout au long du néphron. Chacune de ses parties préside à la réabsorption des ions, du glucose et de l'eau permettant d'obtenir au final une urine concentrée. Ainsi, 180 L de plasma passent par le rein quotidiennement, mais seulement 1 L d'urine est formée. En effet, l'eau, le bicarbonate, le sodium et le chlore sont tous réabsorbés à plus de 99%, le potassium quant à lui, l'est à 93%. Lors de ce processus, le tubule proximal, réabsorbe à lui seul 65 % du sodium et du chlore et quasi 100 % du glucose filtré. La réabsorption de ces éléments se fait d'une part par l'intermédiaire des cotransporteurs sodium-glucose et des antiporteurs sodium-protons, situés tous les deux dans la membrane apicale de la portion initiale du tubule proximal. Le passage paracellulaire de sodium et de chlore, couplé au système de recyclage de l'acide au niveau terminal de ce même tubule, permettent d'autre part, la réabsorption du chlore.

La partie ascendante épaisse de l'anse de Henlé, réabsorbe également le chlore et le sodium mais dans un pourcentage inférieur. Il le fait grâce au cotransporteur sodium / potassium / 2 chlore de la membrane apicale.

Le tubule distal procède à la réabsorption de sodium et de chlore ainsi qu'à la sécrétion de potassium et de proton, par les jeux d'un cotransporteur sodium-chlore, d'un antiporteur sodium-potassium, et d'un autre antiporteur sodium-proton qui se situent tous les trois dans la membrane apicale. Finalement, en ce qui a trait au néphron, il se termine par le tubule collecteur qui possède deux types de cellules, les cellules principales et les cellules intercalaires. Les premières se caractérisent d'abord par la réabsorption de sodium à l'aide des canaux sodiques, puis par la sécrétion de potassium par des canaux potassiques. Ces canaux sont situés au niveau de la membrane apicale. De plus, il existe deux groupes de cellules intercalaires, α et β . Les cellules α sécrètent des protons par la pompe à protons, et les cellules β réabsorbent cet ion grâce à un antiporteur chlore-bicarbonate que l'on retrouve également dans la membrane apicale.

Outre les fonctions décrites plus haut, le rein exerce des fonctions endocrines. Parmi les hormones sécrétées, l'érythropoïétine régule la production de globules rouges; la vitamine D, en tant que prohormone, régule en sa forme active les concentrations sanguines de calcium et de phosphate; et finalement, la rénine préside au contrôle de la tension artérielle. Cette dernière, élaborée par les cellules de la Macula Densa de l'appareil juxtaglomérulaire, clive l'angiotensine en angiotensine II, laquelle stimule la production d'aldostérone. L'aldostérone favorise à son tour la réabsorption de sodium et d'eau par les tubules rénaux. Le rein réagit également à l'hormone antidiurétique, produite par le lobe postérieur de l'hypophyse qui intervient aussi dans le processus de réabsorption de l'eau par les tubules collecteurs.

La filtration glomérulaire :

Comme nous l'avons déjà mentionné, le néphron préside à la filtration du sang dans le rein. En ce sens, le glomérule est la première structure du néphron à prendre en charge cette fonction. C'est là que s'exerce effectivement la filtration glomérulaire. Contrairement à la notion générale de filtration qui renvoie à l'idée que la substance non voulue reste sur le tamis ou dans la solution récupérée sous le filtre, le glomérule entrave le passage des protéines de poids moléculaires supérieures ou égales à celui de l'albumine. Il laisse néanmoins passer d'autres éléments tels que les acides aminés, le glucose, les différents ions, et les déchets produits par l'organisme. Ce passage non restreint à la lumière urinaire, s'explique par l'action de *transporteurs sélectifs* le long des tubules qui réabsorbent les éléments essentiels en laissant les déchets dans l'urine.

Le glomérule, situé dans le cortex du rein, est composé de plusieurs éléments. Il est d'abord constitué de cellules épithéliales et d'une membrane basale. On y retrouve également un système de circulation sanguin formé par une artériole afférente qui amène le sang au

glomérule pour être filtré, et une artériole efférente qui conduit le sang filtré hors du glomérule. Les éléments transportés dans le sang passent donc du capillaire à l'espace urinaire en franchissant successivement l'endothélium du capillaire, la membrane basale et les pédicelles des podocytes.

La filtration glomérulaire dépend fondamentalement des forces de Starling présentes dans le capillaire. Elles sont divisées en deux forces opposées. La première est la pression hydrostatique qui est produite par la « colonne d'eau » précédant le point de filtration. La deuxième, la pression oncotique, résulte de la pression osmotique générée par la présence de protéines en solution. L'équilibre de ces forces régit le mouvement des fluides, et détermine en dernière instance la filtration (18 à 25). Dans le diabète, comme nous le verrons plus en détails par la suite, la filtration glomérulaire est altérée et les podocytes de même que la membrane basale sont modifiés.

La membrane basale :

La membrane basale se situe entre l'endothélium et les pédicelles. Elle est formée par différents composants de la matrice extracellulaire. La membrane basale glomérulaire diffère de celle des autres tissus dans la mesure où elle est plus épaisse, mesurant entre 300 - 350 nm au lieu de 40 – 50 nm. Elle est constituée par ailleurs de collagène de type IV, de protéoglycanes et de glycoprotéines. La membrane basale semble jouer un rôle essentiel dans la filtration glomérulaire. En effet, elle se trouve altérée dans plusieurs affections qui s'accompagnent de protéinurie. Dans le diabète notamment, la membrane présente une série d'altérations ultrastructurelles (38-42). Nous pouvons constater, par techniques de microscopie électronique, un épaissement de la membrane basale due à la glycation du collagène de type IV (43, 44). Cette dernière modifie la protéine et en retarde la dégradation

conduisant ainsi à une anomalie fonctionnelle de la membrane glomérulaire. (45, 46, 40) De plus, l'albumine glyquée stimule la synthèse de collagène et contribue également à l'épaississement de la membrane. (47, 48 et 49)

Les fentes de filtration:

Les fentes de filtration, situées entre les pédicelles des podocytes, permettent le passage sélectif des différentes molécules issues du sang vers l'urine (26 et 27). Les fentes de filtration sont formées par une structure en feuilles « zipper-like » (11) poreuses, dont les pores sont situés de part et d'autre d'une zone de densité centrale. Ces fentes comprennent une série de protéines membranaires qui interagissent entre elles pour réduire l'espace entre les pédicelles des podocytes qui passe de 20 ou 50 nm, à 8 - 9 nm (28 et 29). Le complexe protéique se rattache au cytosquelette du podocyte participant ainsi aux voies de signalisations. Ces protéines sont à la fois responsables du « turnover » du complexe, de la polarité cellulaire, et de l'organisation du cytosquelette. Parmi les protéines qui constituent les fentes de filtration, la néphrine et la podocine jouent un rôle crucial dans le maintien de ces fentes de filtration.

La Néphrine :

La Néphrine est un produit du gène NPHS 1 localisé dans le chromosome 19 (19q13.1) chez l'homme. Elle a été la première protéine de la fente de filtration à avoir été découverte grâce à l'étude sur la néphrose congénitale de type finlandais. Cette pathologie se caractérise par une mutation du gène NPHS1 qui se traduit par un défaut de production de la Néphrine (30).

Cette protéine est produite dans le rein par les podocytes, les cellules épithéliales du

glomérule (30). Bien qu'elle soit située dans le rein, elle est aussi synthétisée par d'autres tissus tels que le pancréas (cellules β), le cerveau, la rate, les testicules, les membranes fœtales, le placenta et le thymus. C'est en fait une glycoprotéine transmembranaire structurelle, signalétique et d'adhésion, qui veille au maintien du complexe protéique, responsable de la filtration glomérulaire entre les pédicelles des podocytes. Son poids moléculaire est de 185 kDa. Son extrémité N-terminale extracellulaire, qui mesure 35 nm, est formée d'abord d'un domaine fibrine type III, suivi de huit domaines IgG (30). Cette extrémité comprend différents sites potentiels pour la N-glycosylation qui permettent en outre d'interagir, par des liens homophiliques, avec son partenaire du pédicelle adjacent. En revanche, la partie intracellulaire de la Néphrine est riche en résidus tyrosine et sérine et constitue ainsi, des sites potentiels de phosphorylation.

Au niveau des fentes de filtration, la Néphrine s'associe et interagit avec d'autres protéines. En premier lieu, la phosphorylation par la Src kinase (Fyn) d'un résidu tyrosine de la portion intracellulaire de la Néphrine provoque une cascade de signalisations qui stimule des signaux antiapoptotiques. Deuxièmement, dans les fentes de filtration, la Néphrine s'associe à la neph1 et neph2 en formant avec elles, par liaisons hétérophiliques, des hétérodimères. La neph1 et la neph2, qui ne s'associent pas entre elles, sont aussi des protéines transmembranaires formées par une structure semblable à celle de la Néphrine, avec cependant une portion extracellulaire plus courte. Elles jouent un rôle non négligeable dans la signalisation intracellulaire (50). Finalement, la CD2AP est une autre petite protéine intracellulaire importante qui lorsque liée à la Néphrine, veille au maintien des liens *Néphrine- cytosquelette*.

La Podocine :

La Podocine est, à l'instar de la Néphrine, une protéine membranaire. Toutefois, elle est produite exclusivement par le podocyte dans le rein. Cette protéine, de poids moléculaire approximatif de 45 kDa, possède une forme en « C » (hairpin-like structure), son N et C-terminale se trouvent ainsi dans le cytoplasme. Elle fait partie de la famille des stomatines qui est associée aux microdomaines lipidiques. Elle est de plus encodée par le gène NPSH2, situé sur le chromosome 1 (1q25-q31). Les mutations de ce gène sont accompagnées de syndromes néphrotiques familiaux qui résistent aux traitements aux corticoïdes. Ces pathologies se manifestent tôt et sont rapidement progressives.

La Podocine est située dans les fentes de filtration où elle interagit avec d'autres protéines. En effet, elle s'associe à la Néphrine, aux protéines NEPH 1, 2 et 3 et à la CD2AP, via son extrémité C- terminale. Cette association permet de recruter et de stabiliser la Néphrine dans les fentes de filtration mais permet aussi la stimulation de la transduction du signal produit par la Néphrine.

Le diabète :

Le diabète mellitus est très répandu en Amérique du nord; il touche de fait 7.3 % de la population au Québec. Il s'agit d'une maladie métabolique chronique qui se caractérise par l'augmentation des niveaux de glucose dans le sang. Cette hyperglycémie provoque en outre des lésions de plusieurs organes, et affecte particulièrement la microvascularisation (31).

Il existe deux formes de diabète, le type 1 et le type 2. (32) Le diabète type 1 est aussi appelé diabète juvénile en raison de son apparition précoce chez les patients. En effet, il se manifeste parfois même avant l'âge de 15 ans. Selon les chiffres officiels de santé Canada

(http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/dic-dac99/d20_e.html), le diabète de type 1 représente 10% de la totalité des cas recensés. Il est dû à un défaut de la production d'une des hormones responsables de réguler le glucose sanguin, l'insuline. Cette défaillance peut être causée soit par une destruction auto-immunitaire, soit par une lésion destructrice des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'étiologie auto-immunitaire semble liée à un défaut génétique du complexe d'histocompatibilité de classe II (33). Finalement, cette affection se manifeste chez le patient par une hypoinsulinémie et une hyperglycémie. C'est pourquoi elle répond à l'administration d'insuline.

Le diabète type 2, par contre, se caractérise par une résistance des myocytes, des adipocytes et des hépatocytes, aux effets de l'insuline. En effet, ces cellules ne réagissent pas aux niveaux d'insuline sanguin. Cette affection se manifeste surtout chez l'adulte dans la quarantaine. Cette moyenne d'âge tend cependant à diminuer et des cas peuvent même apparaître chez l'adolescent. L'obésité, le vieillissement et une diète riche en sucres raffinés sont des facteurs déterminants dans l'apparition de cette pathologie. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure les facteurs héréditaires de l'étiologie de cette affection (34). Bien que ce type de diabète se présente avec une hyperglycémie, le patient possède au début des niveaux élevés d'insuline dans le sang, et ne répond donc pas à l'administration d'insuline. La réponse périphérique de l'insuline doit par conséquent être augmentée par l'utilisation de médicaments qui sensibilisent davantage les cellules à l'action de l'insuline, tels que les thiazolidinediones (51). Par ailleurs, d'autres options thérapeutiques peuvent être considérées, tel que les biguanines qui agissent en réduisant la production hépatique de glucose (51).

La polyurie, la polydipsie, la polyphagie et un trouble de la vision sont les symptômes caractéristiques du diabète. La première est due à la néphropathie diabétique qui se présente avec une protéinurie, soit une augmentation des protéines éliminées dans l'urine. Cette néphropathie se caractérise par un syndrome néphrotique, qui comprend une polyurie, une

albuminurie et une protéinurie plus élevée que 3.5 g par jour. Cette maladie rénale progressive est, la cause principale d'insuffisance rénale chronique et de dialyse.

En la microscopie optique, la néphropathie diabétique se présente par une sclérose glomérulaire composée de nodules acellulaires amorphes (35 et 36), de dépôts hyalins positifs au PAS et quelques fois même, de débris nucléaires. Les nodules acellulaires apparaissent en périphérie des glomérules, déplaçant les capillaires vers l'extérieur. Lors de lésions plus avancées, le glomérule devient une masse scléreuse amorphe dépourvue de toutes fonctions. Outre la sclérose glomérulaire nodulaire, on peut observer dans le mésangium, une accumulation de substance membranoïde positive au PAS, appelée sclérose glomérulaire diffuse. Cette croissance de la matrice mésangiale, qui n'entraîne pas pour autant d'augmentation du nombre de cellules mésangiales, est visible en microscopie électronique(37).

Grâce à cette technique, nous pouvons observer chez les diabétiques certaines altérations de la membrane basale glomérulaire (MBG), notamment la modification des macromolécules par l'hyperglycémie. Nous constatons également une modification de la distribution et de l'organisation ultrastructurale des glycoprotéines (37, 38 et 39), telle que l'accumulation du collagène de type IV dans la MBG expliquée plus haut. (45,46 et 40). Outre cette accumulation, nous pouvons également observer une augmentation de la production de collagène, résultat d'une hausse locale des niveaux de TGF- β (41).

Suite à une longue période d'hyperglycémie, nous pouvons constater dans les glomérules rénaux, un détachement des podocytes de la membrane basale (52 et 53). Chez les humains, ceci est accompagné par un effacement des pédicelles des podocytes.

Les complications du diabète ne sont pas limitées au rein. En effet, les patients diabétiques souffrent d'autres complications à court et à long terme: cardiopathies (angine, infarctus du

myocarde), ophtalmopathies (rétinopathie diabétique, cataracte), neuropathies périphériques (sensoriel, moteur et autonome), cétoacidose (complication aiguë, urgence médicale) et risques de gangrène (pieds diabétiques).

Le but du projet:

La néphropathie diabétique conduit à une altération de la filtration glomérulaire. À l'origine, cette dernière était attribuée aux modifications observées dans la MBG. Cependant, l'étude d'autres types de néphropathies ne présentant pas cette caractéristique, a démontré que l'altération de la filtration glomérulaire pouvait être en fait le résultat d'un défaut de Néphrine et de Podocine dans les fentes de filtration (30). Compte tenu par ailleurs, que le diabète et le vieillissement provoquent une altération de la filtration glomérulaire, jusqu'ici attribuée uniquement à la MBG, nous pensons à la lumière des études déjà réalisées, qu'une diminution des protéines ci-haut citées, peuvent aussi être responsables d'une telle altération. Ainsi, à l'aide de techniques d'immunocytochimie soutenues par des techniques biochimiques, nous tenterons de démontrer que l'altération de la concentration de Néphrine et de Podocine au niveau des fentes de filtration, se manifeste autant avec le diabète qu'avec l'âge.

Schéma 1:

L'anatomie macroscopique du rein.

Schéma du haut: vue externe du rein droit. Nous pouvons y observer (du haut vers le bas), l'artère rénale, la veine rénale et l'uretère.

Schéma du bas: coupe coronale du rein droit. Nous pouvons y voir les pyramides de Malpighi (foncées), les colonnes de Bertin (plus claires, situées entre les pyramides) et les papilles (les orifices situées dans les calices.)

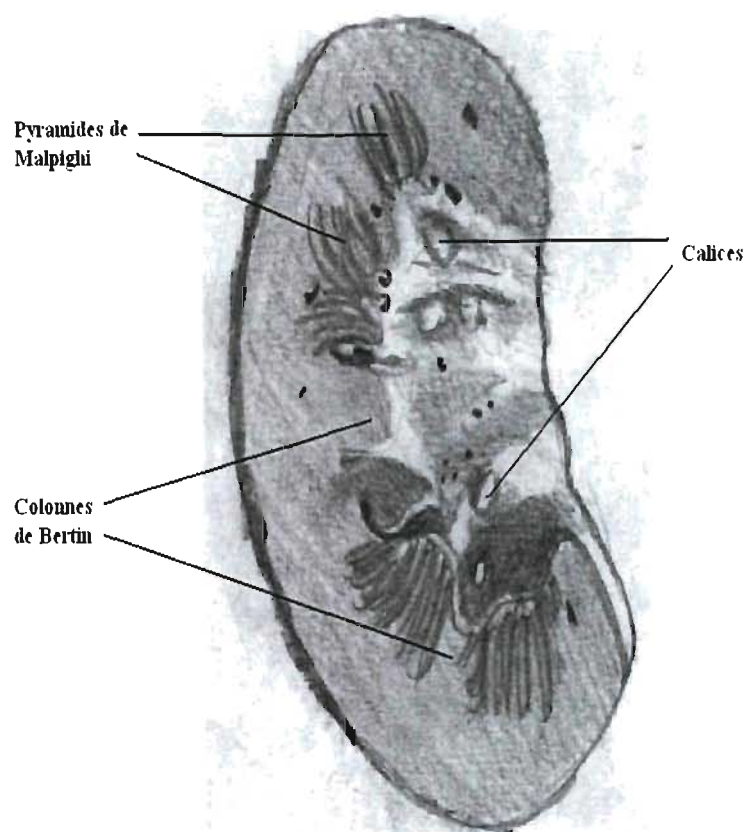
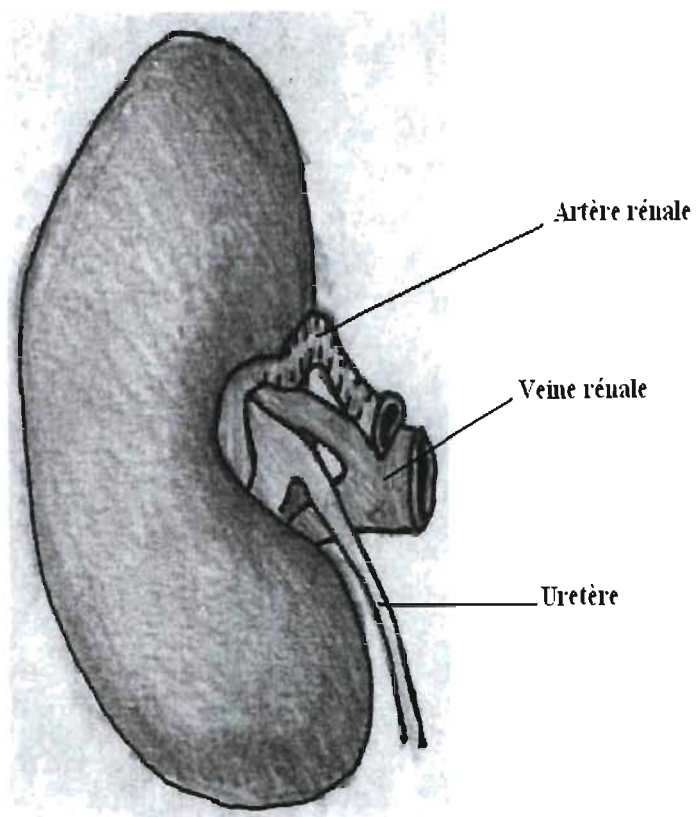


Schéma 2:

L'anatomie du néphron.

Nous pouvons y observer le bouquet glomérulaire et les artérioles afférente et efférente. L'espace urinaire débouche dans le tubule proximal qui lui même termine dans l'anse de Henlé (segment plus mince que le tubule proximal.) L'anse de Henlé forme une boucle et remonte vers le cortex du rein; ses parois deviennent plus épaisses (la portion épaisse de l'anse de Henlé), pour ensuite terminer dans le tubule distal, près du glomérule. Ce dernier débouche finalement dans le tubule collecteur.

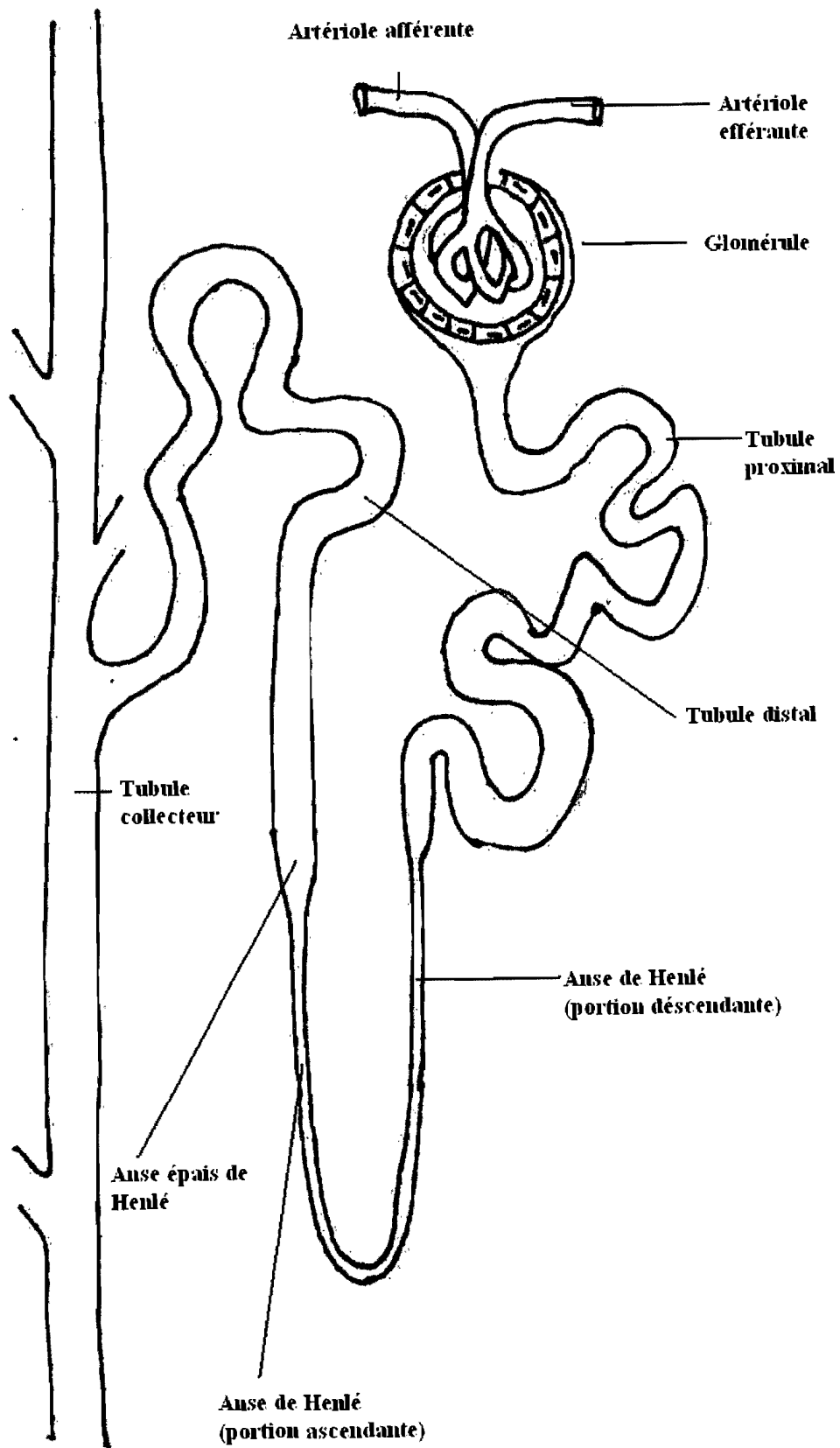


Schéma 3:

Les podocytes, anatomie et localisation.

Les podocytes projettent des extensions cytoplasmiques qui entourent les vaisseaux sanguins.

Si nous observons de plus près, nous pouvons voir qu'entre les vaisseaux et l'espace urinaire nous avons (d'intérieur à l'extérieur, et dans le schéma, du bas vers le haut) l'endothélium, la membrane basale et les cellules épithéliales appelées podocytes.

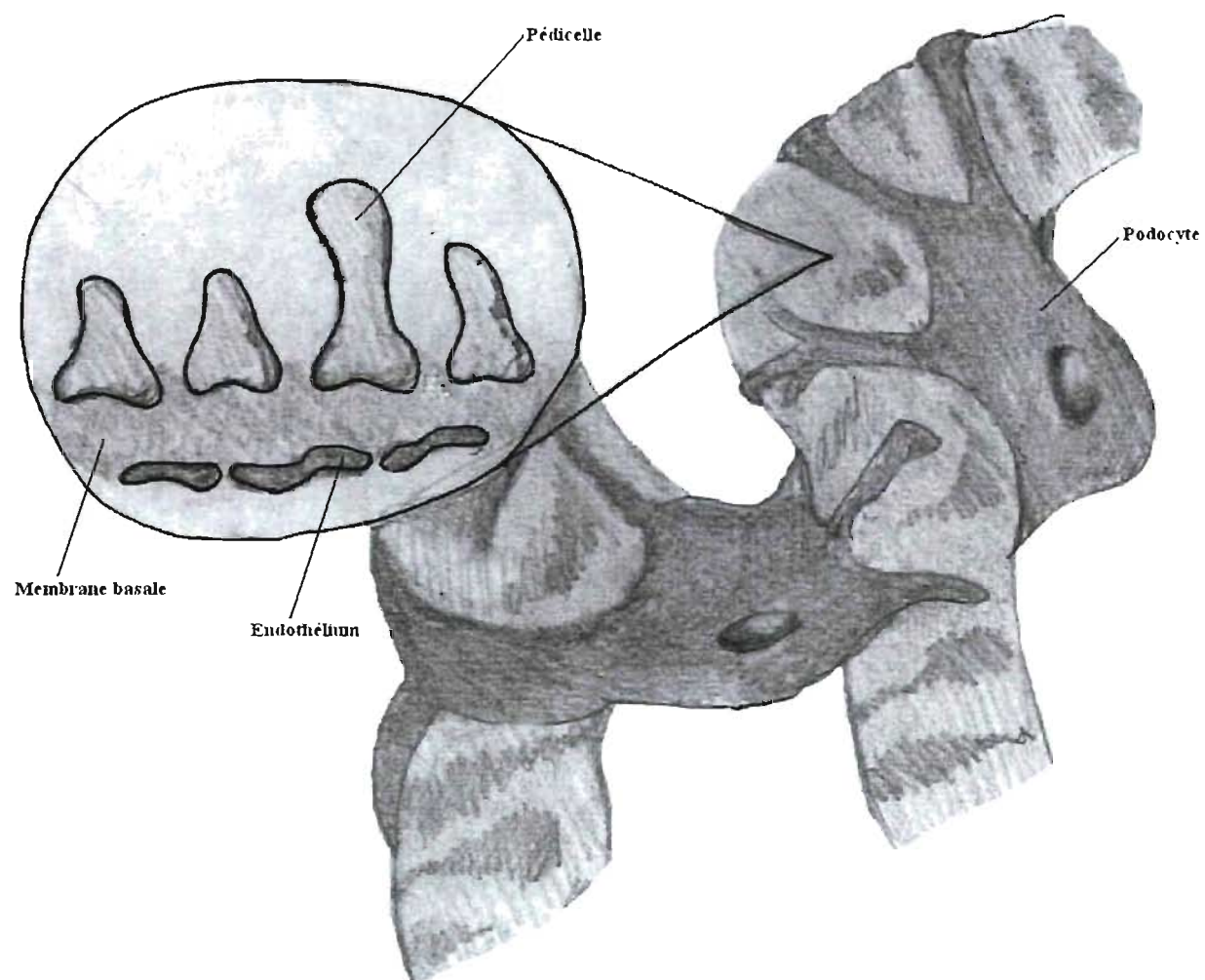
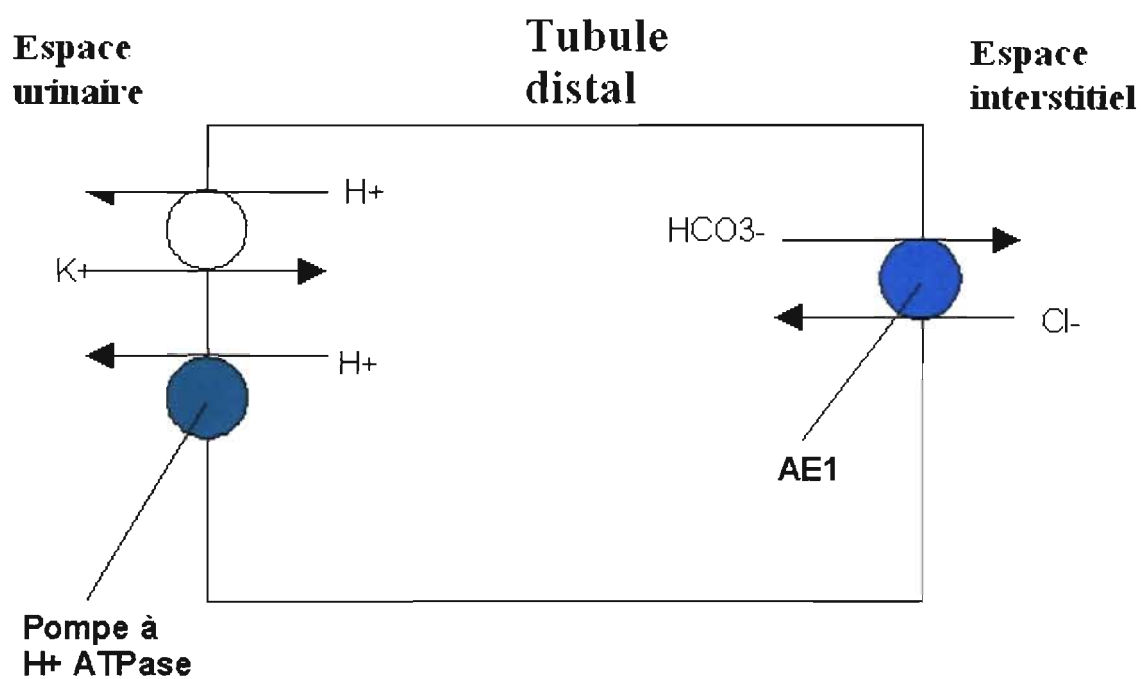
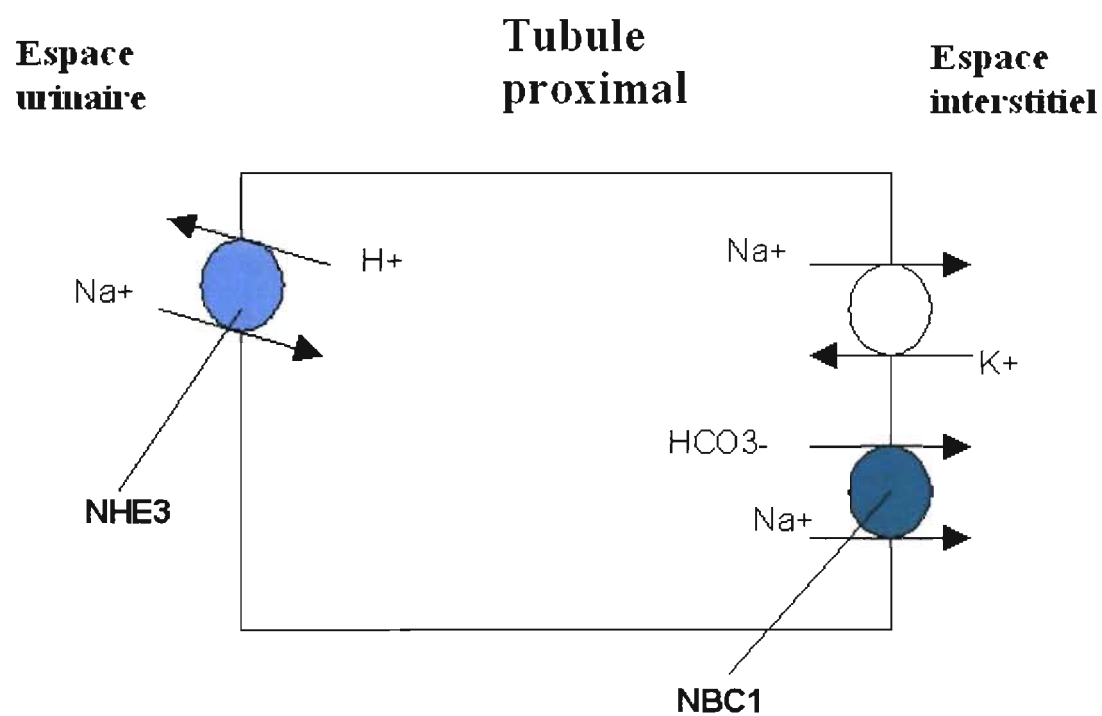


Schéma 4:

Les canaux ioniques des différents segments du néphron.

Le schéma du haut: Nous observons ici, l'emplacement du NBC1, chargé de cotransporter le bicarbonate et le sodium vers l'espace interstitiel, et celui du NHE3 responsable d'échanger le H^+ de la cellule pour du sodium dans le tubule proximal.

Le schéma du bas: Nous observons ici, l'emplacement du AE1, chargé d'échanger le bicarbonate de la cellule pour du chlore, et la pompe à proton dépendante d'ATP responsable d'expulser les protons vers l'espace urinaire.



Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes:

Le modèle animal :

Douze rats mâles Sprague Dawley âgés de 1 mois (Charles River Co. St Constant, Canada) ont été sélectionnés pour ce projet. Ceux-ci ont été séparés en quatre groupes égaux selon deux consignes, l'âge (trois mois et douze mois) et le fait qu'il soit contrôle ou diabétique. Ces rats ont reçu (par injection) une dose de streptozotocine intrapéritonéale (70mg/kg de poids corporel, dissous dans une solution de citrate 10 mM, pH 4.5). La streptozotocine détruit les cellules β du pancréas, ce qui induit un état hyperglycémique, protéinurique et hypoinsulinémique. Les rats recevaient de la nourriture et de l'eau ad libitum. La glycémie était mesurée mensuellement à l'aide de bandes d'essai Accucheck^{lm} lues par un glucomètre (Roche diagnostics, Laval, Canada). La glycosurie était mesurée sur des bandes d'essai Uriscan (VWR International, Montréal, Canada).

Nous avons utilisé pour cette étude, trois rats pour chacun des quatre groupes suivants : groupe contrôle 3 mois, groupe contrôle 12 mois, groupe diabétique 3 mois, et groupe diabétique 12 mois. En ce sens, il a été montré que trois ou quatre rats par groupe sont suffisants pour montrer une tendance significative (40, 54, 55, 56). Les rats hyperglycémiques pesaient en moyenne $392 \text{ g} \pm 15$ ($n = 3$) après trois mois et $390 \text{ g} \pm 26$ ($n = 3$) après 12 mois. Leurs contrôles normoglycémiques respectifs pesaient $400 \text{ g} \pm 17.7$ ($n = 3$) et $767 \text{ g} \pm 33$ ($n = 3$). Les niveaux de glycémie pour les rats diabétiques ont montré une moyenne de $25.87 \text{ mM} \pm 3.3$ ($n = 3$) pour les rats de trois mois, et de $26.84 \text{ mM} \pm 38$ ($n = 3$) pour les rats de douze mois, comparativement à $4.84 \text{ mM} (\pm 0.81; n = 3)$ et à $7.93 \text{ mM} (\pm 0.82; n = 3)$ pour leurs contrôles respectifs.

Isolation glomérulaire :

Les rats ont été anesthésiés par une injection d'uréthane (0.1 mg pour 100 g de poids de rat). Les rats ont passé la nuit à jeun pour l'expérience, et ils ont été manipulés suivant les directives du Conseil canadien sur les soins des animaux. Leurs reins ont été prélevés et placés dans une solution saline tampon (PBS, tampon phosphate salin 0.01 M, pH 7.4; NaH_2PO_4 0.2622g/l; NaHPO_4 1.1502g/l; NaCl 9g/l). Les glomérules ont été isolés par la méthode de tamisage séquentielle (57). Les échantillons ont été passés brièvement sur un tamis de 125 μm . Les produits obtenus ont ensuite été passés sur un tamis de 180 μm , sous lequel se trouvait un autre tamis de 106 μm . Entre ces deux derniers, nous avons récupéré les glomérules isolés que nous avons lavés dans du PBS et que nous avons suspendus ensuite dans un tampon de lyse (50 mM tris-HCl, pH7.4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0.25 % déoxycholate ; 1 mM orthovanadate de sodium ; 1 % Nonidet ; 2 μg Aprotinin / ml ; 1 mM PMSF) préparé le jour même. Après homogénéisation, les échantillons ont été laissés sur la glace pendant 1 heure. Les homogénats ont alors été centrifugés (2500 r.p.m.) pendant 20 minutes à 4°C. Les culots protéiques glomérulaires ont ensuite été utilisés pour la mesure des concentrations protéiques à l'aide d'un kit d'essai protéique non interférant (Non-interfering protein assay) (Micro BCA protein assay reagent kit, Pierce, II. U.S.A.)

Fixation des tissus:

Les échantillons de tissus ont été immergés dans une solution de paraformaldéhyde-lysine-périodate (constituée de sodium métapériodate à 0.01 M, sucrose à 0.06 M, lysine à 0.075 M et paraformaldéhyde 4 %) (McLean et Nakane 1974) (58) à 4% pendant 2 heures à 4°C, puis

ils ont été rincés dans un tampon phosphate 0.1 mM pH 7.4. Par la suite, ils ont été déshydratés dans des bains successifs contenant des pourcentages croissants de méthanol : 30% à 4°C pendant 5 minutes, 50% à 4°C pendant 5 minutes, 70 % à -10°C pendant 5 minutes, et 90% à -20°C pendant 30 minutes. Finalement, ils ont été figés à -30°C dans une résine Lowicryl K4M (CANEMCO, Lakefield, Canada), selon une technique d'abord décrite par Kellenberger (59) puis modifiée par Bendayan (60). Les échantillons ont été laissés 1 heure dans un mélange Lowicryl K4M / méthanol 90 % (ratio de 2 :1) à -20°C, puis toute la nuit dans une solution Lowicryl K4M à -20°C. Les tissus dans leur résine ont été par la suite placés sous lumière ultraviolette pendant huit jours, pour permettre la polymérisation.

La microtomie :

Une fois la polymérisation complétée, les blocs obtenus ont d'abord été taillés en forme de pyramide à l'aide d'une lame de rasoir, puis ils ont été assemblés sur un ultramicrotome (ultracut S. de Reichert), pour finalement être coupés en sections minces (80 nm) au couteau de verre. Les échantillons obtenus ont été montés ensuite sur des grilles de nickel recouvertes de carbone et d'un film de Parlodion.

Les anticorps:

L'anticorps anti-Podocine humaine (polyclonal, développé chez le lapin) a été acheté chez Alpha Diagnostic International (San Antonio, U.S.A.). Il reconnaît une séquence peptidique de 16 acides aminés à l'extrémité C-terminale, qui est semblable à 93% à celle du rat. L'anticorps anti-Néphrine de rat (polyclonal, développé chez le lapin) provient du même fournisseur. Il reconnaît un peptide de 20 acides aminés situé également à l'extrémité C-

terminale de la Néphrine. Deux autres anticorps (polyclonaux) pour la Néphrine humaine ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Ca. U.S.A.). Il s'agit du sc-19 000 (N-20) et du sc-28 192. Ces deux anticorps reconnaissent des séquences dans la partie extracellulaire de la protéine. Le Sc-19 000 (N-20) (développé chez la chèvre) reconnaît un peptide situé à proximité de l'extrémité N-terminale. Le sc-28 192 (H-300) (développé chez le lapin) est spécifique à une séquence contenue entre les acides aminés 23 et 322. Pour l'immunocytochimie nous avons utilisé des anticorps IgG anti-lapin couplés à des particules d'or de 5 nm (BBI International, U.K.).

L'immunocytochimie:

Les coupes de tissus ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante sur une goutte de solution saturée de métapériodate de sodium. Elles ont été lavées trois fois à l'eau, pendant 2.5 minutes chaque fois, et déposées sur une goutte d'ovalbumine à 1% pendant 5 minutes. Les incubations ont été poursuivies avec les anticorps primaires anti-Néphrine et anti-Podocine d'Alpha Diagnostics (à une concentration au 1:5) au courant de la nuit et ce, à température ambiante. En revanche, nous avons procédé pour les anticorps Sc 28 192 à des incubations pendant 2 heures à température ambiante, puis à 4°C durant le reste de la nuit à une dilution de 1:10. Les grilles ont alors été lavées au PBS, puis incubées une première fois sur une goutte d'ovalbumine à 1% pendant 5 min., et une deuxième fois avec des complexes d'IgG-Or (5nm dans le cas des anticorps d'Alpha Diagnostics, et 10nm dans celui du sc-28 192 de Santa Cruz) pendant 45 min. Les grilles ont été lavées à nouveau au PBS et à l'eau, consécutivement. Le contraste a été obtenu en plaçant les grilles sur une goutte d'acétate d'uranyle 3 % pendant 6 min. Ces grilles, après avoir été lavées au jet d'eau pendant 30 secondes, ont été examinées avec un microscope électronique Philips 410Ls.

Afin de vérifier la spécificité des anticorps utilisés en immunocytochimie, nous avons observé le marquage non-spécifique obtenu dans l'espace urinaire, l'endothélium et les mitochondries des tissus utilisés; et aucun marquage significatif n'a pu y être constaté. De plus, nous avons observé quelques grilles incubées qu'avec l'anticorps secondaire conjugué avec l'or colloïdal ou la protéine A-or ; et à nouveau, aucun marquage spécifique n'a pu y être constaté.

La morphométrie:

Les photos ont été prises à un grossissement de 69 000X, puis analysées avec le logiciel d'analyse Clemex Vision (Qc, Canada) pour la quantification précise du marquage de Néphrine et de Podocine sur le tissu glomérulaire. Deux glomérules (vingt photos prises pour chacun) ont été considérés pour chaque animal. Pour définir les mesures de la membrane du podocyte, celle-ci a été divisée en trois sections: la membrane à la base, les fentes de filtration et la membrane liminale. Leurs longueurs respectives ont été mesurées et nous avons compté les particules d'or associées. Les valeurs obtenues ont été exprimées en particules par micromètre «contrôles de spécificité».

L'immunobuvardage:

Les échantillons (40µg chacun) ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes dans le tampon de charge de Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 % Glycérol, 2 % SDS, 5 % β -Mercaptoéthanol (55)). Ils ont été déposés par la suite sur un gel de polyacrylamide à 6% pour la Néphrine, et à 7% pour la Podocine. Ces protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (à 4°C avec du méthanol). Les membranes ont été saturées pendant 1 heure dans du TBST (10mM tris [pH 7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween) contenant

de l'albumine bovine sérique 1% pour la Podocine, et du lait sans matières grasses à 1% pour la Néphrine. Elles ont été ensuite incubées avec leurs anticorps respectifs dans une solution TBST / lait (ou TBST / albumine bovine sérique) jusqu'au lendemain. Le marquage fut alors révélé grâce à la trousse de détection de chimiluminescence Lumi-light et exposé sur film photosensible Kodak-x-OmaT-AR. Les densités des bandes ont été mesurées grâce aux logiciels Scion et Excel qui ont été utilisés pour réaliser le travail de comparaison de densitométrie.

Résultats

Résultats:

L'immunocytochimie:

Les tissus :

Pour ces expériences, nous avons analysé des coupes de tissus de rats âgés de trois et de douze mois, répartis en groupes contrôles et diabétiques. Nous avons pu noter un épaississement de la membrane basale chez les rats diabétiques et chez les rats de 12 mois du groupe contrôle, comparativement aux rats du groupe contrôle de trois mois. Nous n'avons observé cependant, aucune fusion de pédicelles des podocytes entre les différents tissus.

La Néphrine :

Nous avons utilisé un anticorps anti-Néphrine dirigé à la portion intracellulaire de la protéine. Nous avons pu observer dès lors un marquage spécifique sur les membranes des pédicelles des podocytes pour tous les groupes évalués. Afin de mieux caractériser ce marquage, la membrane des pédicelles a été divisée en trois parties : la membrane à la base, la membrane liminale et la membrane pour les fentes de filtration. Au niveau de cette dernière, nous avons noté un marquage plus important pour les tissus du groupe contrôle de trois mois (**Fig. 1 et 2**). Nous avons également constaté chez les rats diabétiques de 3 et de 12 mois, un marquage inférieur à celui des groupes contrôles respectifs. Cette différence est aussi observable chez les rats contrôles âgés qui présentent un marquage inférieur à celui de leurs contreparties jeunes.

Nous avons réalisé des décomptes en morphométrie de façon à pouvoir quantifier les observations obtenues en immunocytochimie. La concentration du marquage au niveau des fentes de filtration chez les jeunes rats contrôles, représente ainsi 70 % des particules d'or comptées sur la membrane des pédicelles des podocytes **(tableau I) (fig. 3)**. Les membranes à la base et les membranes luminales représentent respectivement 16.2 % et 13.8 % du marquage total. L'étude comparative des tissus confirme les observations réalisées.

Nous avons constaté par ailleurs, une diminution significative du marquage au niveau des diaphragmes chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles. En ce qui a trait aux rats jeunes, la baisse chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles est de 81,5 %. **(tableau II) (fig. 4)**. Chez les rats âgés, la baisse est de 57.5 %. Au sein des groupes contrôles, nous avons constaté chez les rats âgés un marquage inférieur à celui des jeunes.

Nous avons observé une tendance similaire entre les groupes de rats diabétiques et de contrôles au niveau de leurs membranes à la base. En effet, pour les rats jeunes, les résultats ont montré une diminution de 30% chez les diabétiques par rapport à ceux du groupe contrôle. Pour les rats âgés, la diminution des diabétiques en comparaison des rats du groupe contrôle est de 44%. Une baisse au sein même du groupe contrôle a également été observée chez les rats âgés par rapport aux jeunes.

En ce qui a trait à la membrane liminale, bien que nous ayons observé une baisse de 62% du marquage chez les jeunes rats diabétiques, en comparaison des rats du groupe contrôle correspondant, nous n'avons pas noté de différence significative entre les rats âgés répartis dans les deux groupes. Nous avons toutefois constaté une diminution du marquage chez les rats âgés du groupe contrôle par rapport aux jeunes rats contrôles. Par ailleurs, l'espace urinaire, les vaisseaux sanguins, la membrane basale et les cellules endothéliales étaient tous dépourvus de marquage spécifique.

Nous avons utilisé par la suite un deuxième anticorps anti-Néphrine, dirigé cette fois-ci à la partie extracellulaire de la protéine afin de vérifier, dans les cas de diabète ou de vieillissement, l'existence ou non d'un clivage de la protéine au niveau de la membrane des pédicelles chez les rats.

Nous avons noté pour tous les tissus observés, un marquage spécifique de la membrane des pédicelles des podocytes. Ce marquage se concentrait davantage au niveau des fentes de filtration chez les jeunes rats contrôles. Nous avons constaté par ailleurs, une diminution du marquage chez les rats diabétiques comparativement aux rats du groupe contrôle. Cette baisse est aussi visible chez les rats adultes par rapport aux rats jeunes qui composent le groupe contrôle.

Nous avons à nouveau réalisé des études en morphométrie afin de quantifier les résultats observés. Ces études ont corroboré nos observations dans la mesure où la concentration du marquage au niveau des fentes de filtration chez les rats contrôles de trois mois, représentait 56,7% des particules d'or comptées sur la membrane des pédicelles. **(tableau I) (fig. 3) (fig. 5)**. Les membranes à la base et les membranes luminales représentent respectivement 23% et 20,3% du marquage total. L'analyse comparative des différents tissus confirme en outre les observations obtenues. En effet, nous avons constaté une différence considérable du marquage aux différents niveaux de la membrane des pédicelles et ce, pour tous les groupes de rats observés.

Nous avons noté au niveau des fentes de filtration, une diminution de 79% du marquage chez les jeunes rats diabétiques par rapport au marquage des jeunes rats contrôles. De même, une baisse de 69% a été observée chez les rats diabétiques âgés de douze mois comparativement aux rats adultes contrôles. Aussi, nous avons constaté une baisse considérable du marquage chez les rats adultes contrôles par rapport aux jeunes rats de ce même groupe. **(Tableau III) (fig. 6)**

Les études en morphométrie du marquage de ce deuxième anticorps confirment les différences observées au microscope électronique au niveau des membranes à la base.

Nous avons noté une baisse de 65 % du marquage chez les jeunes rats diabétiques par rapport aux jeunes rats contrôles. Chez les rats de douze mois, nous avons également observé une diminution de marquage de 32% chez les rats diabétiques en comparaison des rats contrôles. Au sein des groupes contrôles, une diminution a aussi été remarquée chez les rats de douze mois par rapport à ceux de trois mois.

Ces mêmes études n'ont toutefois montré aucune différence significative au niveau des membranes lumineales des pédicelles chez les jeunes rats des deux groupes. En effet, nous avons relevé 1,62 particules d'or par μm chez les jeunes rats contrôles, et 1,3 particules d'or par μm chez les jeunes rats diabétiques. Nous avons par contre constaté une diminution chez les rats âgés. En effet, le marquage des rats de douze mois du groupe diabétique indiquait une baisse de 56,6% par rapport aux rats de douze mois du groupe contrôle.

La Podocine:

Nous avons utilisé des anticorps anti-Podocine dirigés à la portion C-terminale de la protéine. Nous avons observé, pour les différents groupes, un marquage spécifique aux membranes des pédicelles des podocytes. Comme pour le marquage de la Néphrine, nous avons divisé la membrane des pédicelles en trois: la membrane à la base, la membrane lumineale et la membrane formant les fentes de filtration. Pour les tissus du groupe contrôle de trois mois, nous avons constaté un marquage plus important au niveau des fentes de filtration. **(Fig. 7 et 8)**. À l'instar des observations obtenues pour la Néphrine, le marquage pour la Podocine diminue aussi chez les rats diabétiques par rapport aux rats du groupe contrôle. Nous avons

aussi noté une diminution entre les rats contrôles de trois mois et ceux de douze mois.

Les décomptes en morphométrie ont également montré ici une concentration du marquage au niveau des fentes de filtration chez les jeunes rats contrôles. En effet, le marquage à ce niveau représente 80.7% des particules d'or comptées sur la membrane des pédicelles **(tableau I) (fig. 3)**. En revanche, les membranes à la base et les membranes luminales ne représentent que 8.1 % et 11.2 % respectivement du marquage total.

Nous avons constaté, au niveau des fentes de filtration, une baisse importante de 67% du marquage chez les jeunes rats diabétiques par rapport aux jeunes rats du groupe contrôle. Pour ce qui est des rats âgés, la diminution du marquage chez les diabétiques est de 57.5% en comparaison de ceux du groupe contrôle. Dans ce dernier groupe, nous avons constaté chez les rats de 3 mois un marquage inférieur à celui des rats de 12 mois. **(Tableau IV) (fig. 9)**

Au niveau des membranes à la base, les études en morphométrie n'ont montré aucune différence significative du marquage chez les rats de trois mois des deux groupes étudiés, ni d'ailleurs au sein même des groupes contrôles. En effet, nous pouvons noter 0.78 particules d'or par μm chez les rats de 3 mois du groupe contrôle, 0.73 particules d'or par μm chez les rats de 3 mois du groupe diabétique, et 0.81 particules d'or par μm pour les rats âgés du groupe contrôle. Nous constatons, par contre, une diminution de 37 % chez les rats de 12 mois diabétiques par rapport aux rats de 12 mois du groupe contrôle.

En ce qui a trait au marquage de la membrane luminale, nous avons constaté une tendance similaire à celle relevée au niveau des fentes de filtration. Ceci vient donc confirmer les résultats observés en immunocytochimie. En effet, le marquage diminue de 45,5% chez les rats de 3 mois diabétiques par rapport aux jeunes rats du groupe contrôle. De même, une baisse de 50,9% a été constatée chez les rats adultes diabétiques comparativement aux rats adultes du groupe contrôle. Il se produit également une diminution chez les rats adultes par rapport aux jeunes rats des groupes contrôles. Finalement, suite à l'évaluation des particules

d'or au niveau des vaisseaux sanguins, de la membrane basale, des cellules endothéliales et de l'espace urinaire, aucun marquage significatif n'a pu être observé.

L'immunobuvardage:

La Néphrine:

Les homogénats des tissus des jeunes rats des groupes contrôles et diabétiques, ainsi que ceux des rats âgés contrôles, ont d'abord été déposés sur des gels de polyacrylamide à 6%, puis, ils ont été transférés sur des membranes de nitrocellulose qui ont été par la suite incubées en présence d'anticorps anti-Néphrine. Nous avons observé sur ces membranes deux bandes à différentes masses moléculaires. (**fig. 10**).

La plus lourde des deux bandes se situe à 185 kDa, ce qui représente la masse moléculaire de la Néphrine. Nous avons observé que le signal de cette bande est semblable pour les différents homogénats de tissus d'un même groupe.

Pour pouvoir quantifier les variations des signaux entre les différents groupes, nous avons réalisé des mesures de densitométrie pour chacune des bandes obtenues. (**fig. 11**) Bien que nous ayons relevé peu de variations entre les trois groupes étudiés, nous avons tout de même constaté une légère augmentation du signal de la bande du groupe des jeunes rats diabétiques par rapport à celui des jeunes rats contrôles, et une autre augmentation, toute aussi légère du signal des rats âgés contrôles par rapport aux jeunes rats contrôles. Ces variations demeurent toutefois non significatives.

La deuxième bande observée sur la membrane de nitrocellulose, se situe aux alentours de 90 kDa. Le signal de celle-ci augmente considérablement chez les jeunes rats diabétiques et chez

les rats de douze mois du groupe contrôle.

Nos mesures densitométriques confirment par ailleurs ces observations, et montrent une importante augmentation du signal chez les rats diabétiques de trois mois comparativement aux rats contrôles de trois mois. Le signal pour les rats âgés contrôles augmente aussi par rapport à celui des jeunes rats contrôles. L'intensité de ce signal reste cependant en dessous de celle des jeunes rats diabétiques.

La Podocine:

Pour la Podocine, nous avons suivi le même protocole mentionné préalablement, en utilisant cependant, des gels de polyacrylamide à 7 %. Par la suite, les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec l'anticorps anti-Podocine. Comme pour la Néphrine, nous avons pu observer deux bandes. (**fig. 12**)

La plus légère se situe à 45 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire de la protéine. Cette bande montre des différences significatives entre les homogénats de chaque groupe. Ainsi, les rats diabétiques de trois mois et les rats contrôles de douze mois affichent une augmentation significative du signal par rapport à celui obtenu chez les jeunes rats contrôles.

La densitométrie de cette bande confirme les résultats observés (**fig. 13**). En effet, nous pouvons constater une forte augmentation du signal chez les rats diabétiques de 3 mois comparativement à celle des rats contrôles du même âge. Par ailleurs, les rats contrôles âgés accusent également un plus fort signal que les jeunes rats du même groupe.

La bande supérieure possède finalement une masse moléculaire aux alentours de 90 kDa. Son intensité présente peu de variations entre les différents groupes étudiés. En effet, nos mesures de densitométrie montrent des niveaux semblables de signal pour les trois différents groupes.

Figure 1:

Sur cette figure, nous observons un marquage en immunocytochimie de la Néphrine avec des particules d'or de 5 nm, (anticorps dirigé à la partie intracellulaire de la Néphrine) au niveau d'un glomérule chez un rat contrôle de trois mois. Nous pouvons noter un marquage qui se concentre dans les fentes de filtration. Plusieurs structures histologiques sont illustrées, les fentes de filtration (A), les membranes à la base (B), les membranes lumenales (C), les podocytes (D), la membrane basale glomérulaire (E) et finalement l'endothélium (F) (Agrandissement : 68 250 x)

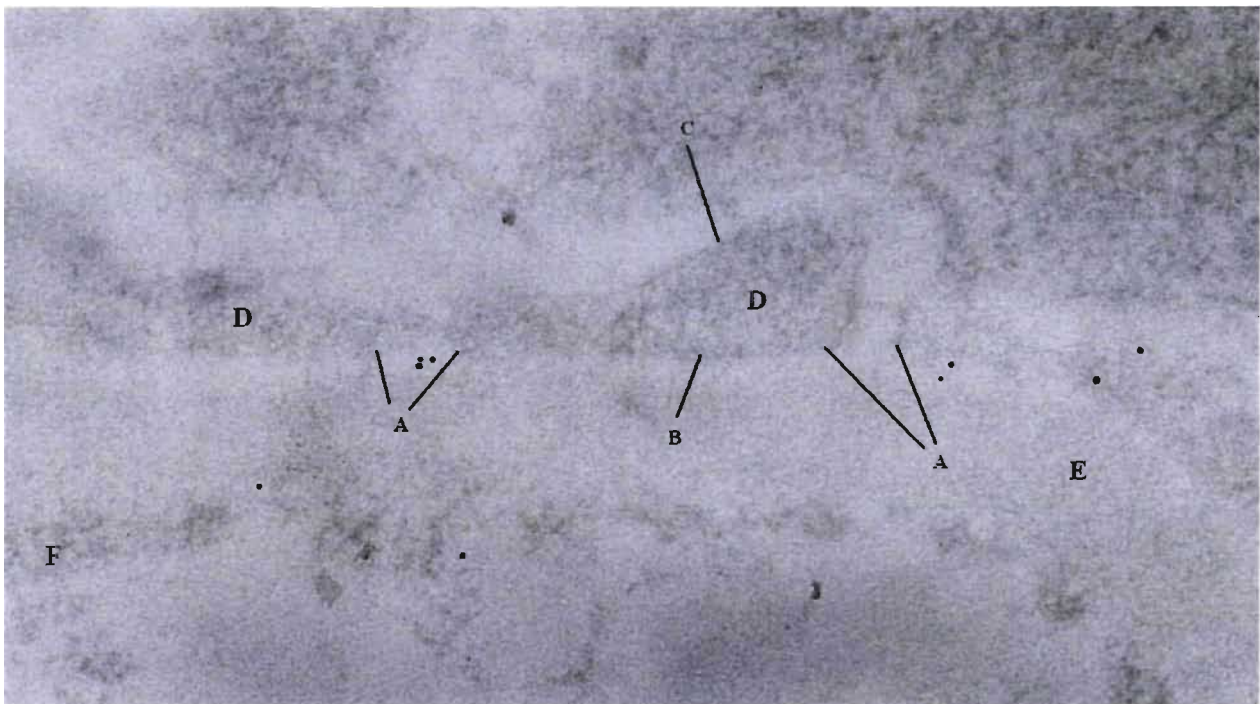


Figure 2:

Nous observons également sur cette figure un marquage en immunocytochimie de la Néphrine avec des particules d'or de 5 nm (anticorps dirigé à la partie intracellulaire de la Néphrine), au niveau d'un glomérule chez un rat contrôle de trois mois. Nous pouvons à nouveau, noter un marquage qui se concentre dans les fentes de filtration. Plusieurs structures histologiques sont illustrées, les fentes de filtration (A), les membranes à la base (B) et finalement, les membranes luminales (C). (Agrandissement : 155 400 x)

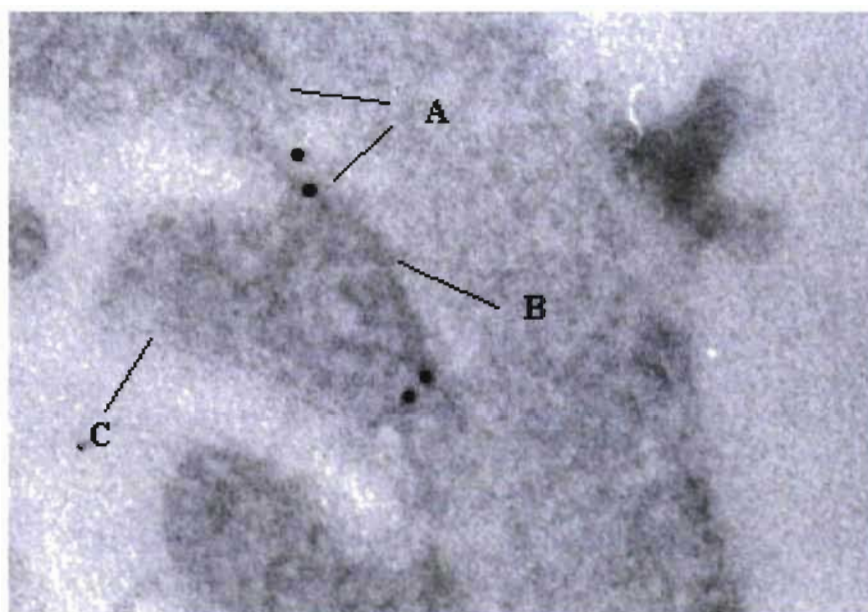


Tableau I:

Nous observons dans ce tableau, le pourcentage relatif à chaque compartiment étudié (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale) du décompte total de particules d'or chez les contrôles de trois mois (pour les anticorps anti-Néphrine dirigés au C et au N-terminale et pour les anticorps anti-Podocine utilisés.) Nous pouvons constater que le marquage des deux protéines se concentre au niveau des fentes de filtration.

Pourcentage du marquage pour les différentes protéines dans les différents compartiments

	Néphrine C-terminale	Néphrine N-terminale	Podocine
Membranes à la base	16.2	23	8.1
Fentes de filtration	70	56.7	80.7
Membranes luminale	13.8	20.3	11.2
Nombre d'images analysées	180	120	180

Figure 3:

Nous illustrons par ces graphiques, les pourcentages relatifs à chaque compartiment étudié (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale) du décompte total de particules d'or chez les contrôles de trois mois (pour les anticorps anti-Néphrine dirigés au C et au N-terminale, et pour les anticorps anti-Podocine utilisés.) Nous avons analysé 180 images pour les grilles incubées avec les anticorps anti-Podocine et anti-Néphrine (dirigés à la partie C-terminale), et 120 images pour les grilles incubées avec les anticorps anti-Néphrine (dirigés à la partie N-terminale). Chaque graphique possède trois colonnes, soit le marquage sur la membrane à la base, les fentes de filtration et la membrane luminale. Les fentes de filtration possèdent le plus grand pourcentage de marquage.

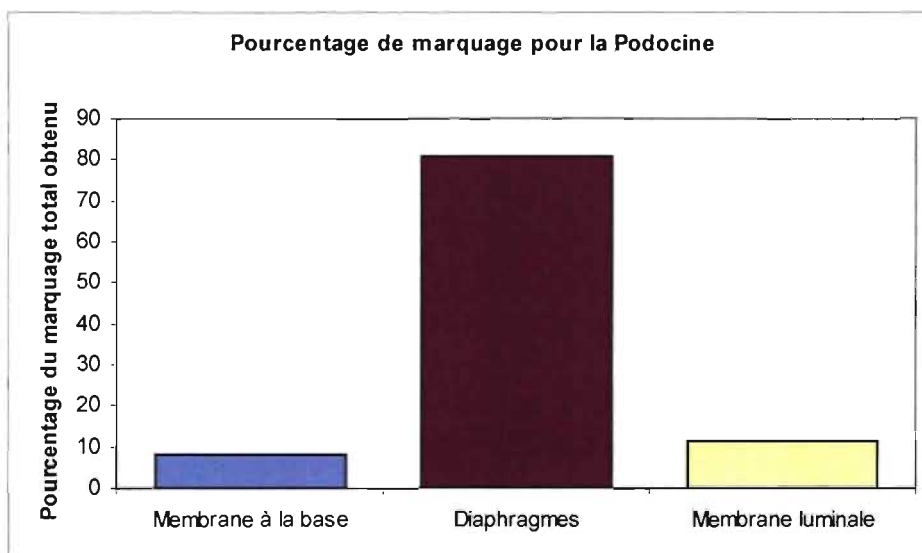
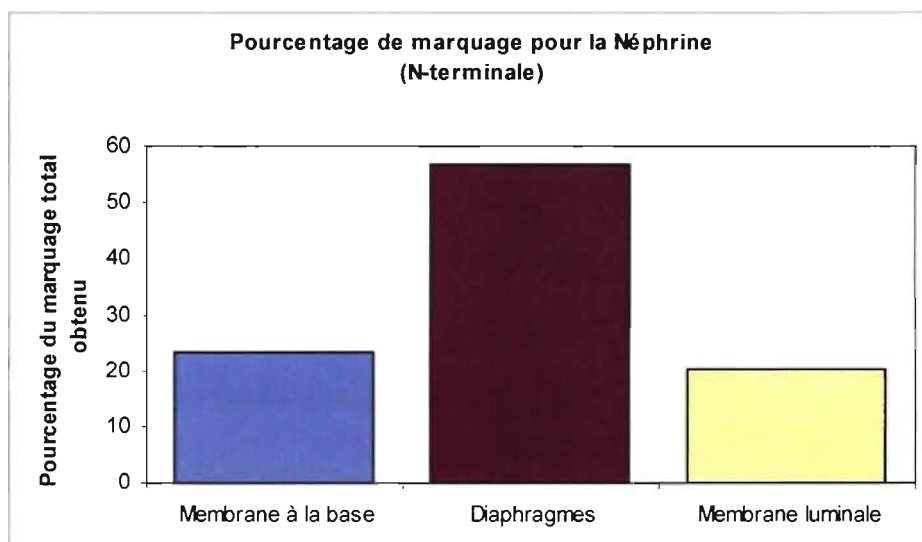
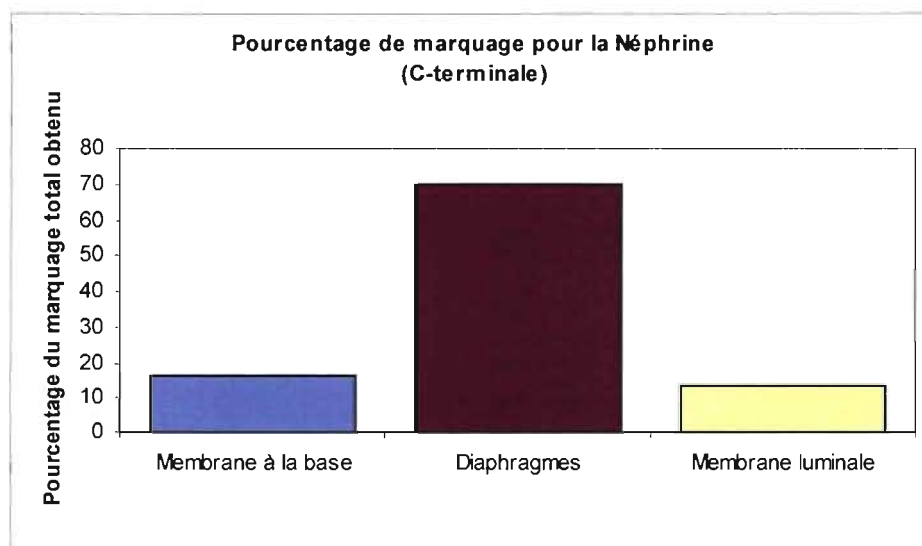


Tableau II :

Nous observons dans ce tableau, les résultats des études morphométriques du marquage de la Néphrine (anticorps dirigé à la partie intracellulaire de la Néphrine) dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale) et ce, pour les quatre groupes étudiés. Ce marquage est exprimé en particules d'or par μm . Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe, dans les différents compartiments. Les valeurs observées pour l'endothélium ont été relevées afin de vérifier la spécificité du marquage.

NÉPHRINE (C-terminale)

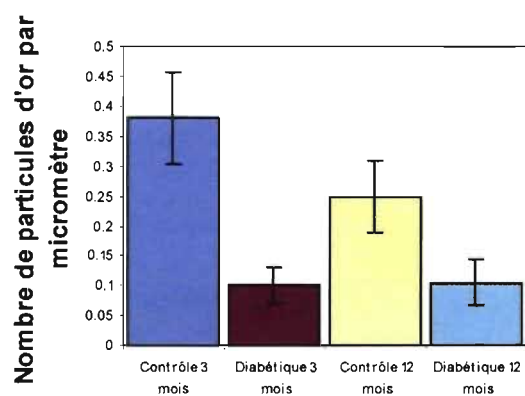
	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	0,338	0,1	0,25	0,105
écart type:	1,65	0,74	1,27	0,8
écart type a la moyenne:	0,076	0,03	0,061	0,037
Nombre de mesures réalisées	480	520	441	459
	diaphragme	diaphragme	diaphragme	diaphragme
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	1,46	0,27	0,47	0,20
écart type:	4,48	1,57	2,41	1,34
écart type a la moyenne:	0,154	0,052	0,083	0,05
Nombre de mesures réalisées	852	915	842	819
	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	0,288	0,108	0,18	0,18
écart type:	1,052	0,56	0,88	0,89
écart type a la moyenne:	0,053	0,027	0,045	0,047
Nombre de mesures réalisées	395	424	385	363
	endothelium	endothelium	endothelium	endothelium
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	0,22	0,18	0,19	0,15
écart type:	1,45	1,06	1,27	1,15
écart type a la moyenne:	0,07	0,058	0,066	0,063
Nombre de mesures réalisées	496	341	370	338

Figure 4 :

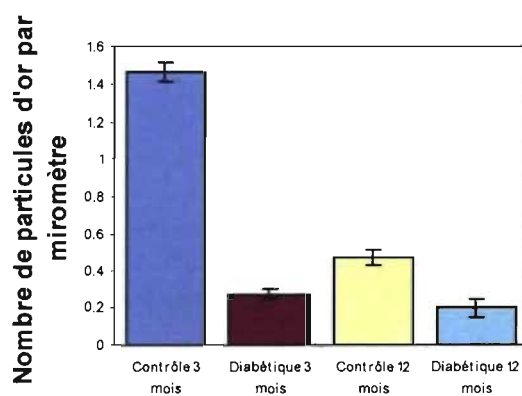
Nous illustrons, par ces graphiques, les différences du décompte du marquage relatif à chaque groupe étudié pour chaque compartiment analysé (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale, endothelium), pour l'anticorps anti-Néphrine dirigé à la partie intracellulaire de la protéine.

Pour chaque valeur de décompte, nous pouvons observer la quantité de mesure réalisée ($n =$) et à quel groupe d'étude il appartient (ctr, contrôle et, stz, diabétique). Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe dans les différents compartiments. Les valeurs observées pour l'endothélium ont été relevées afin de vérifier la spécificité du marquage.

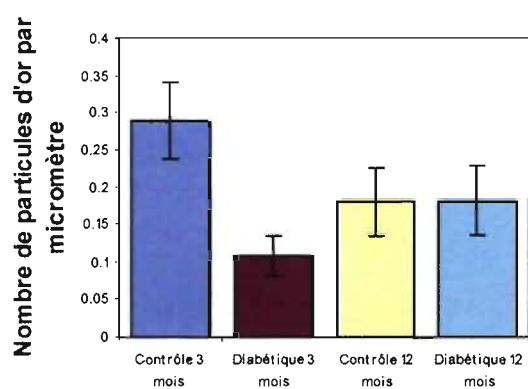
Décompte du marquage obtenu au niveau de la membrane à la base



Décompte du marquage obtenu au niveau du diaphragme



Décompte du marquage obtenu au niveau de la membrane luminale



Décompte du marquage obtenu au niveau de l'endothélium

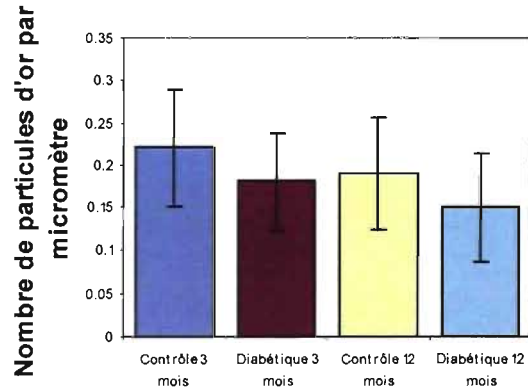


Figure 5 :

Sur cette figure, nous observons un marquage en immunocytochimie de la Néphrine avec des particules d'or de 5 nm (anticorps dirigé à la partie extracellulaire de la Néphrine) au niveau d'un glomérule chez un rat contrôle de trois mois. Nous pouvons noter un marquage qui se concentre dans les fentes de filtration. Plusieurs structures histologiques sont illustrées, les fentes de filtration (A), les membranes à la base (B) et les membranes luminale (C). (Agrandissement : 139 860 x)

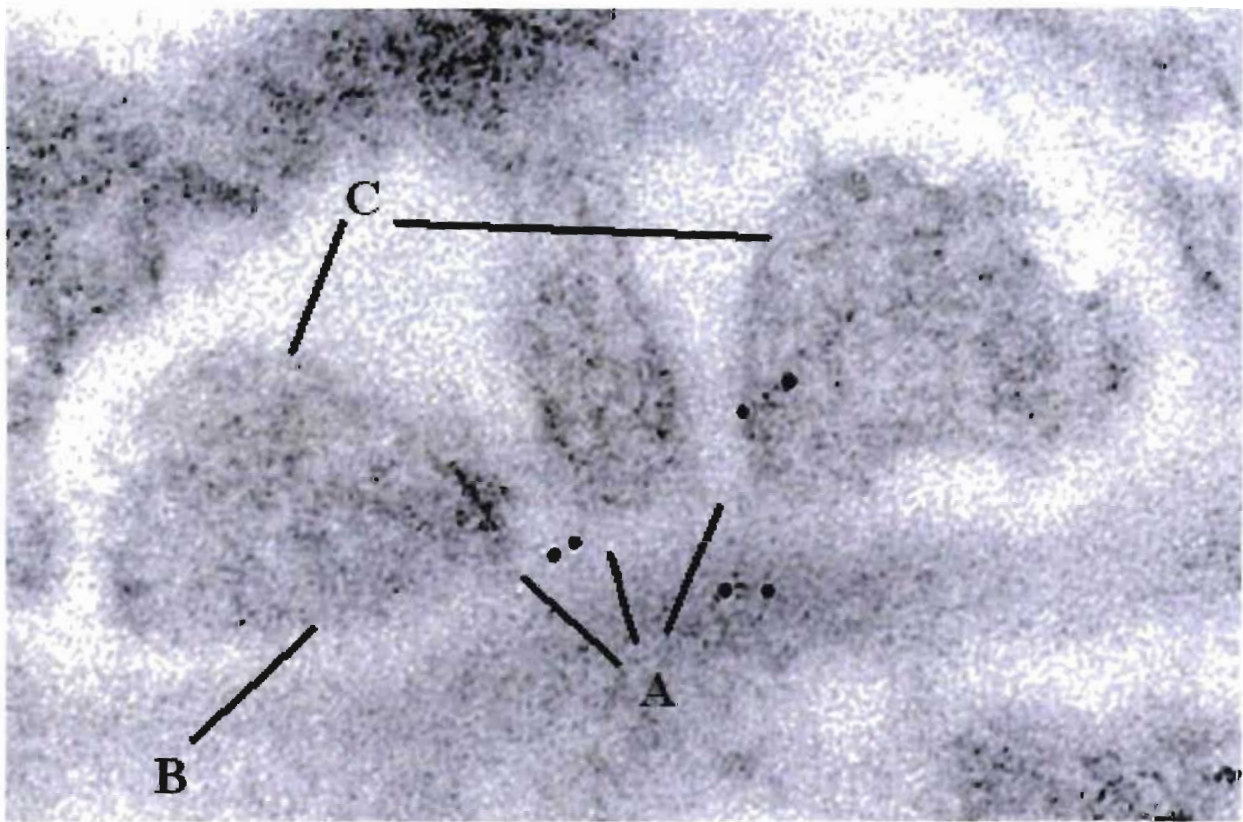


Tableau III :

Dans ce tableau, nous observons les résultats des études morphométriques du marquage de la Néphrine (anticorps dirigé à la partie extracellulaire de la Néphrine) dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale) et ce, pour les quatre groupes étudiés. Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe dans les différents compartiments. Ce marquage est exprimé en particules d'or par μm .

NÉPHRINE (N-terminale)

	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	1,84	0,65	1,57	0,435
écart type:	4,59	2,38	3,159	1,677
écart type a la moyenne:	0,317	0,15	0,214	0,119
Nombre de mesures réalisées	210	239	217	199
	Diaphragme	Diaphragme	Diaphragme	Diaphragme
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	4,52	0,944	2,158	0,673
écart type:	37,709	3,32	4,919	2,276
écart type a la moyenne:	1,94	0,161	0,265	0,119
Nombre de mesures réalisées	377	427	345	365
	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	1,623	1,3	2,88	1,256
écart type:	2,856	2,82	4,25	2,448
écart type a la moyenne:	0,211	0,19	0,325	0,186
Nombre de mesures réalisées	183	220	171	174

Figure 6:

Nous illustrons, par ces graphiques, les différences du décompte du marquage relatif à chaque groupe étudié pour chaque compartiment analysé (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale), pour l'anticorps anti-Néphrine dirigé à la partie extracellulaire de la protéine. Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe dans les différents compartiments.

Pour chaque valeur de décompte, nous pouvons observer à quel groupe d'étude il appartient (ctr, contrôle et, stz, diabétique). Ces graphiques sont le résultat d'analyse de 120 images par groupe d'intérêt. La quantité de mesures est inscrite dans le tableau précédant.

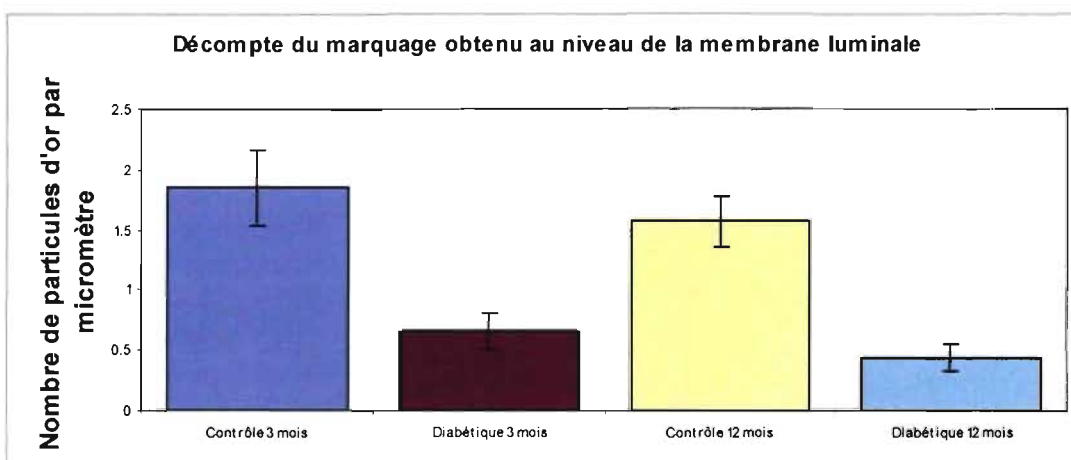
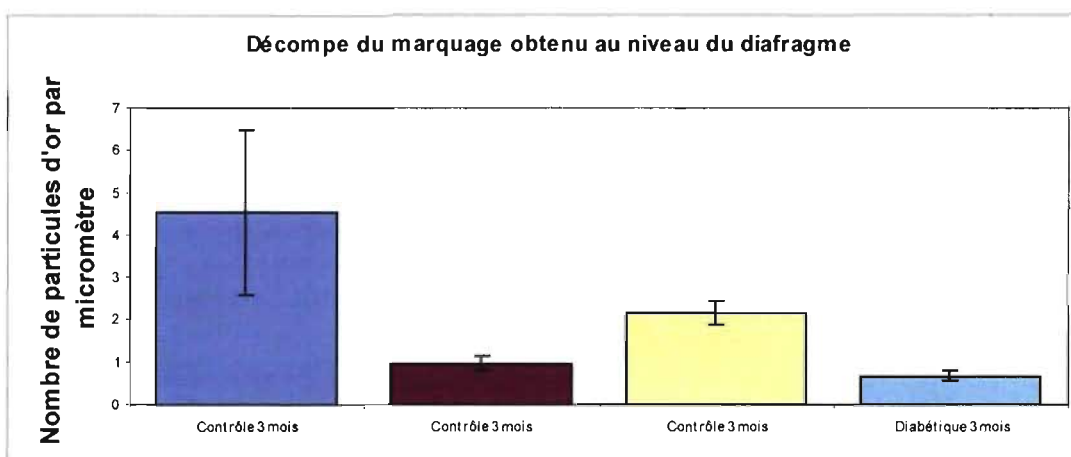
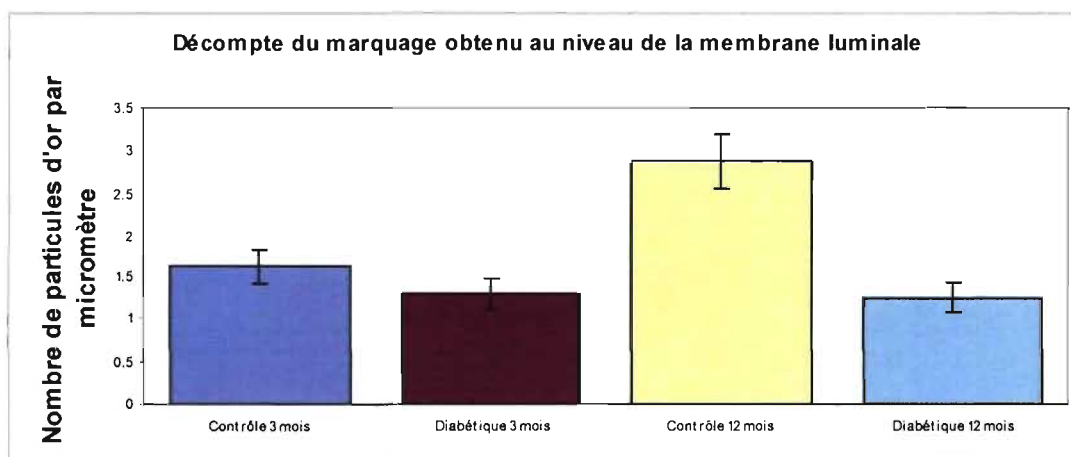


Figure 7 :

Sur cette figure, nous observons un marquage en immunocytochimie de la Podocine avec des particules d'or de 5 nm au niveau d'un glomérule chez un rat contrôle de trois mois. Nous pouvons noter un marquage qui se concentre dans les fentes de filtration. Plusieurs structures histologiques sont illustrées, les fentes de filtration (A), les membranes à la base (B), les membranes luminales (C), les podocytes (D), la membrane basale glomérulaire (E), et finalement l'endothélium (F). (Agrandissement : 33 600 x)

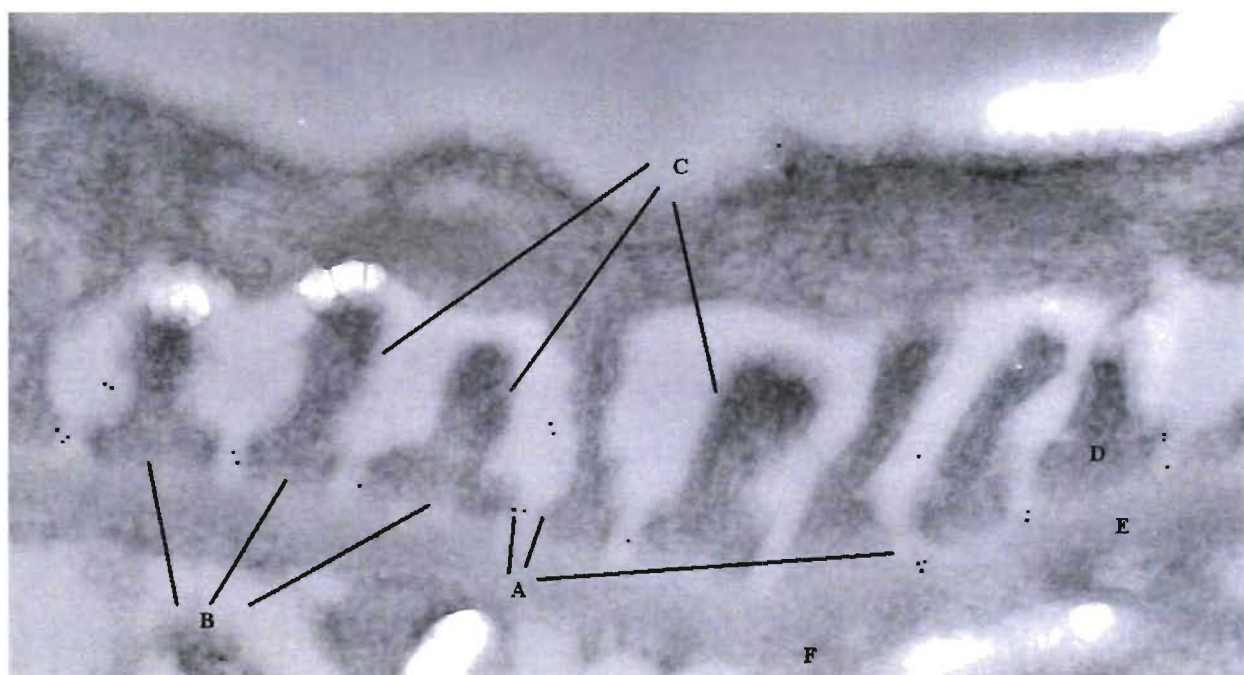


Figure 8 :

Sur cette figure, nous observons un marquage en immunocytochimie de la Podocine avec des particules d'or de 5 nm au niveau d'un glomérule chez un rat contrôle de trois mois. Nous pouvons noter un marquage qui se concentre dans les fentes de filtration. Plusieurs structures histologiques sont illustrées, les fentes de filtration (A), les membranes à la base (B) et les membranes luminale (C). (Agrandissement : 136 500 x)

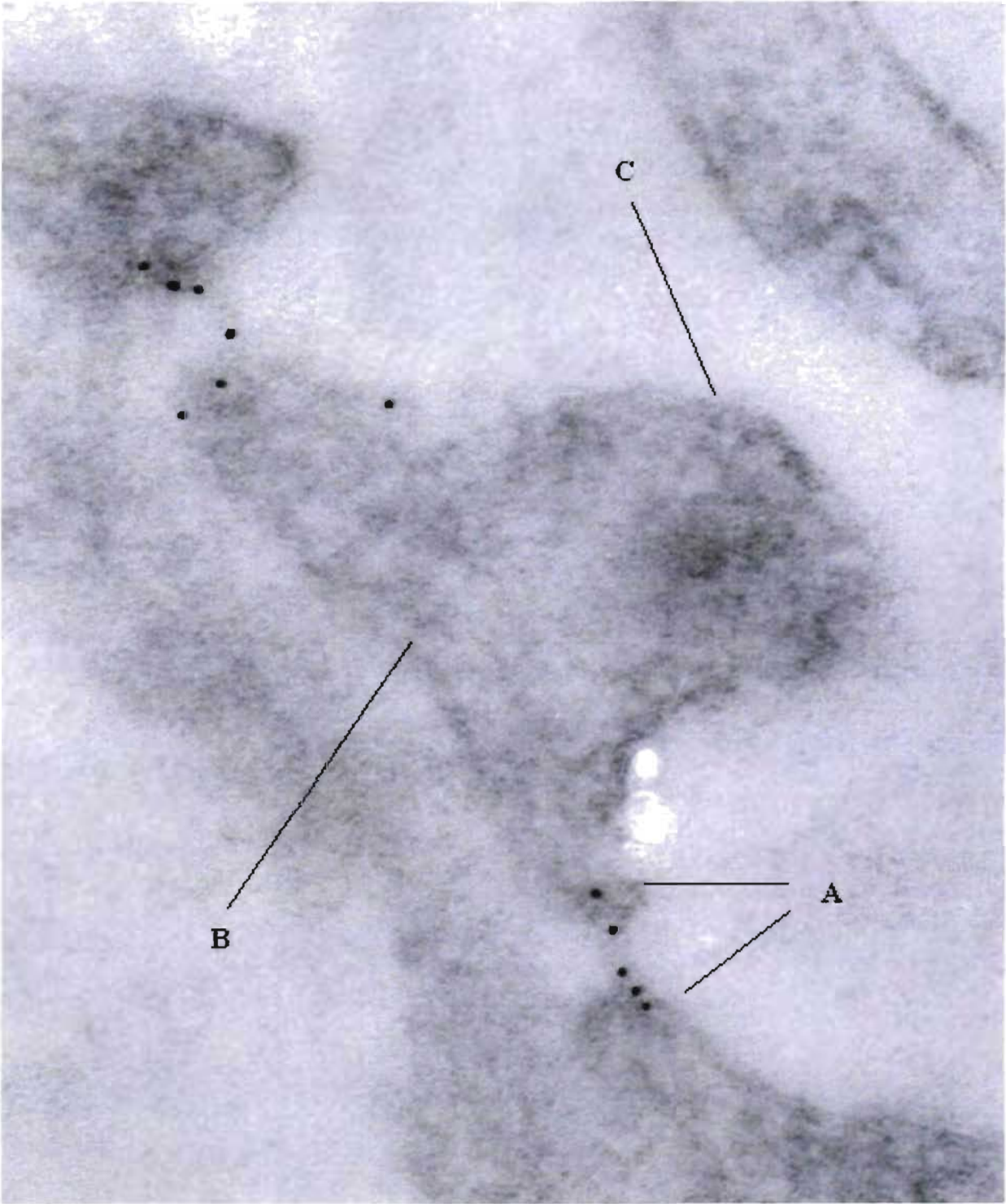


Tableau IV :

Dans ce tableau, nous observons les résultats des études morphométriques du marquage de la Podocine dans les différents compartiments de la membrane des pédicelles (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale et endothelium) et ce, pour les quatre groupes étudiés. Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe dans les différents compartiments. Les valeurs observées pour l'endothélium ont été relevées afin de vérifier la spécificité du marquage. Ce marquage est exprimé en particules d'or par μm .

PODOCINE

	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base	Membrane à la base
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	0,78	0,74	0,81	0,513
écart type:	2,5	2,7	2,9	2,015
écart type a la moyenne:	0,11	0,13	0,13	0,091
Nombre de mesures réalisées	508	420	467	496
	Diaphragme	Diaphragme	Diaphragme	Diaphragme
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	7,76	2,56	7,097	2,09
écart type:	9,56	5,225	16,14	4,8
écart type a la moyenne:	0,33	0,202	0,6	0,17
Nombre de mesures réalisées	817	672	735	769
	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale	Membrane Luminale
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	1,081	0,59	0,61	0,3
écart type:	3,85	1,95	1,927	1,12
écart type a la moyenne:	0,207	0,107	0,102	0,057
Nombre de mesures réalisées	347	332	360	387
	endothelium	endothelium	endothelium	Endothelium
	Contrôle 3 mois	Diabétique 3 mois	Contrôle 12 mois	Diabétique 12 mois
Nombre de particules d'or par μm	0,228	0,15	0,224	0,11
écart type:	1,2	0,89	1,75	0,58
écart type a la moyenne:	0,056	0,043	0,081	0,039
Nombre de mesures réalisées	456	436	468	218

Figure 9 :

Nous illustrons, par ces graphiques, les différences du décompte du marquage relatif à chaque groupe étudié pour chaque compartiment analysé (fentes de filtration, membrane à la base et membrane luminale, endothelium), pour l'anticorps anti-Podocine. Nous pouvons noter la diminution de marquage chez les rats diabétiques par rapport aux rats contrôles du même groupe dans les différents compartiments. Les valeurs observées pour l'endothélium ont été relevées afin de vérifier la spécificité du marquage.

Pour chaque valeur de décompte, nous pouvons observer la quantité de mesure réalisée (n =) et à quel groupe d'étude il appartient (ctr, contrôle et, stz, diabétique)

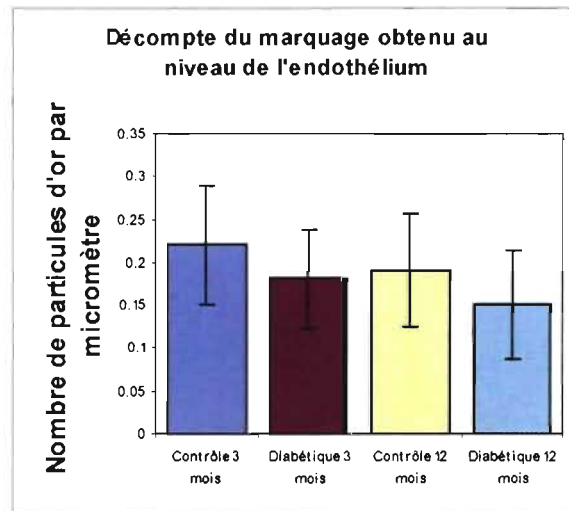
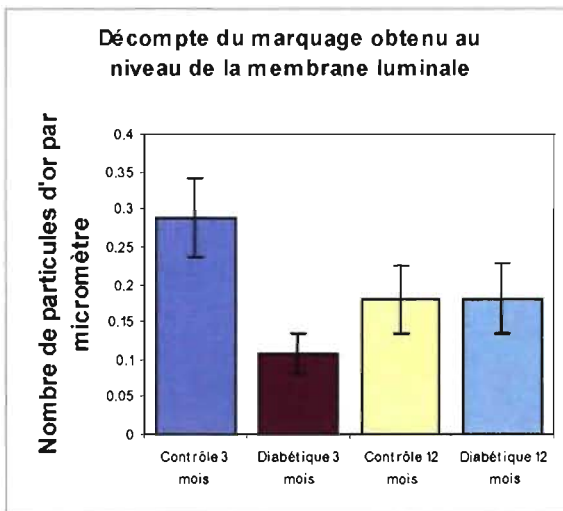
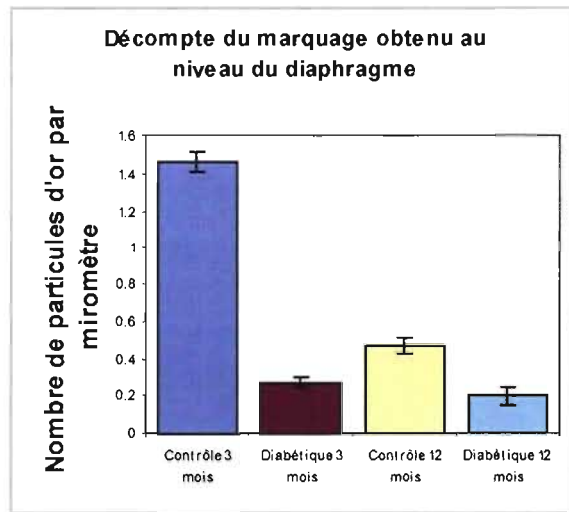
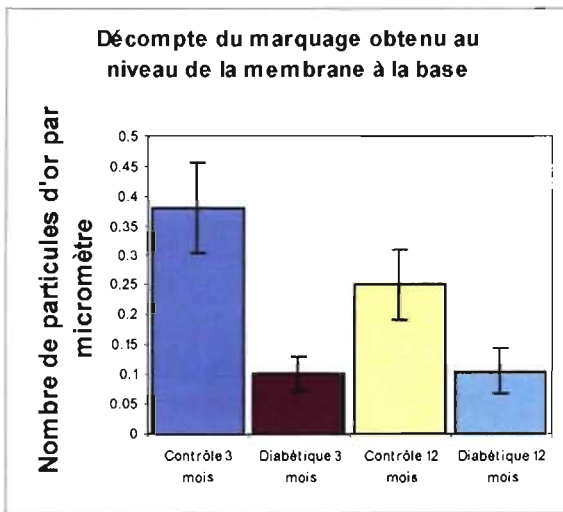


Figure 10 :

Nous pouvons observer sur la page suivante, une image d'une étude en immunobuvardage de la Néphrine pour les trois groupes étudiés (soit, contrôle et diabétique âgé de trois mois, et contrôle âgé de douze mois). Nous notons ici deux bandes. Une située à 180 kDa, laquelle correspond à la masse moléculaire de la Néphrine, et une autre à 90 kDa, masse que nous croyons correspondre à un produit de la dégradation de la protéine. Comme nous l'avons déjà mentionné, nous observons des niveaux similaires de signal pour les bandes situées à 180 kDa, et une augmentation des niveaux des signaux chez les rats diabétiques et les rats âgés par rapport aux jeunes rats contrôles, pour les bandes situées à 90kDa.

Pour cette expérience, nous avons utilisé des échantillons d'homogénats avec une concentration protéique de 40 µg.

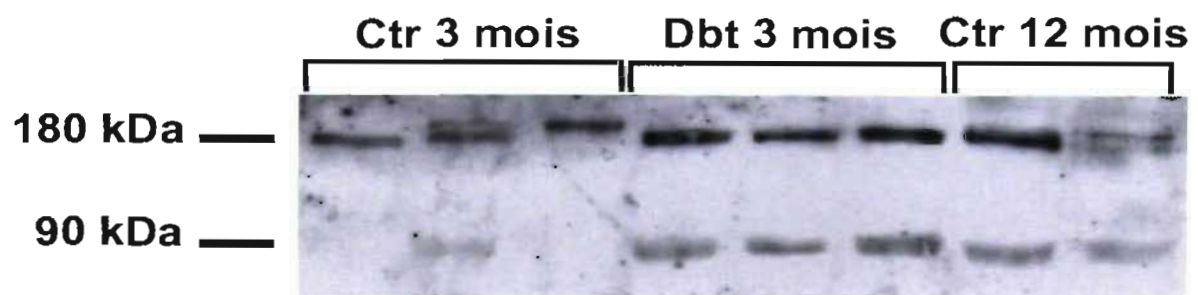


Figure 11 :

Nous observons dans la page suivante, les résultats de l'étude densitométrique d'immunobuvardages de homogénats provenant des différents groupes (contrôle 3 mois, diabétique 3 mois, et contrôle 12 mois), pour la Néphrine. Nous observons des niveaux similaires de signal pour les bandes situées à 180 kDa, et une augmentation des niveaux des signaux chez les rats diabétiques et les rats âgés par rapport aux jeunes rats contrôles, pour les bandes situées à 90kDa. Chaque groupe possède six échantillons (40 µg de protéine) obtenus de trois rats différents (deux échantillons par rat).

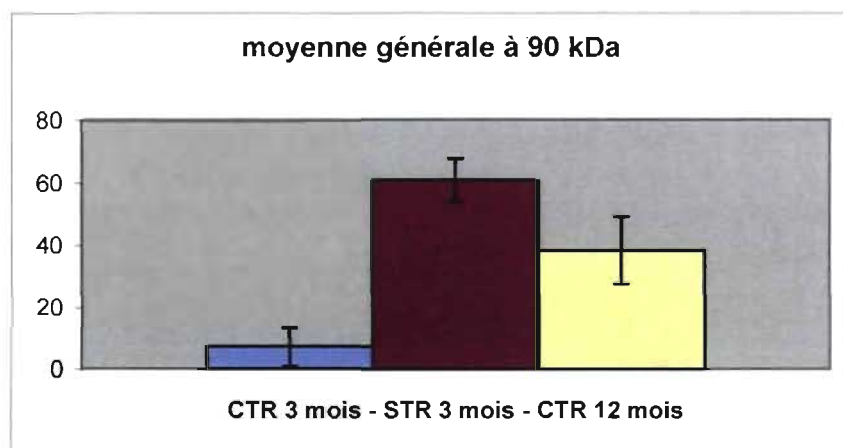
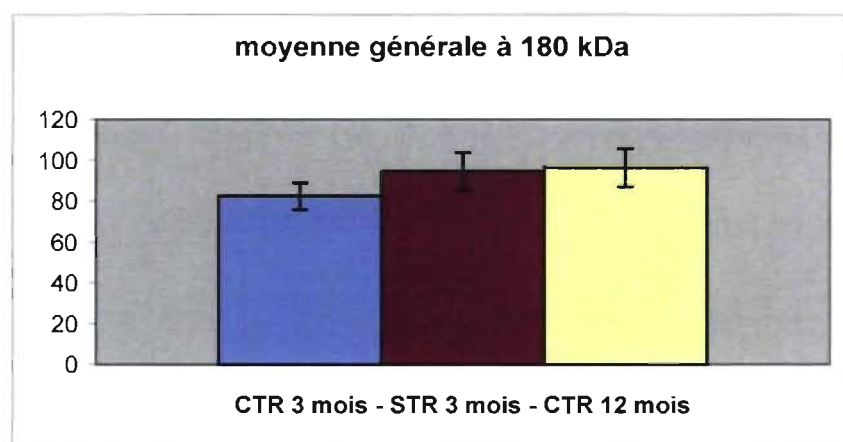


Figure 12 :

Nous pouvons observer sur la page suivante, une image d'une étude en immunobuvardage de la Podocine pour les trois groupes étudiés (soit, contrôle et diabétique âgé de trois mois, et contrôle de douze mois). Nous notons ici deux bandes. Une située à 45 kDa, laquelle correspond à la masse moléculaire de la Podocine, et une autre à 90 kDa, masse que nous croyons correspondre à la protéine dimérisée. Comme nous l'avons déjà mentionné, nous observons des niveaux similaires de signal au niveau des bandes situées à 90 kDa, et une augmentation des niveaux des signaux chez les rats diabétiques et les rats âgés par rapport aux jeunes rats contrôles, pour les bandes situées à 45kDa.

Pour cette expérience, nous avons utilisé des échantillons d'homogénats avec une concentration protéique de 40 µg.

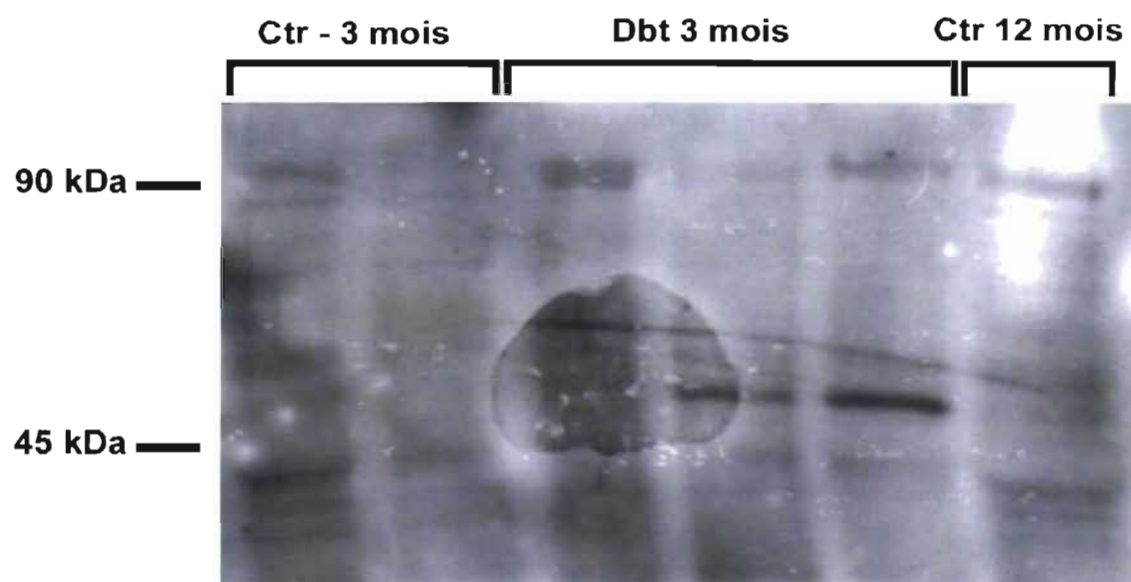
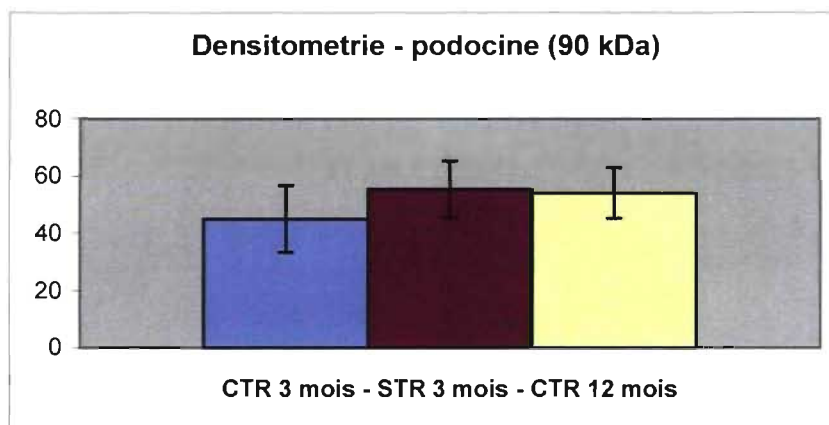
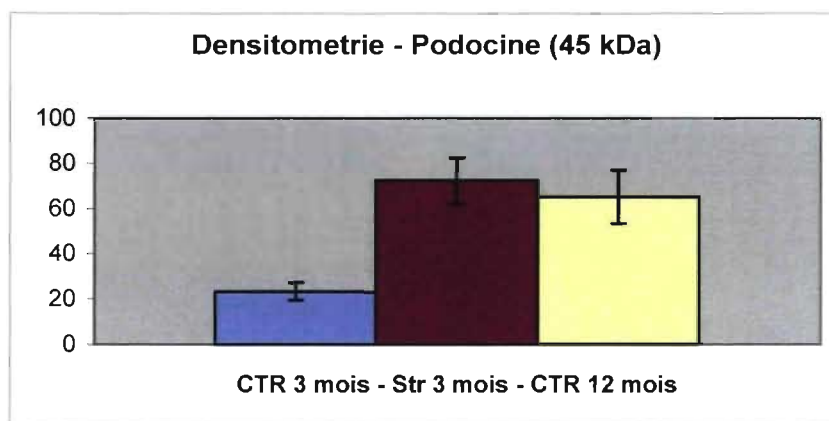


Figure 13 :

Nous observons dans la page suivante, les résultats de l'étude densitométrique d'immunobuvardages de homogénats provenant des différents groupes (contrôle 3 mois, diabétique 3 mois, et contrôle 12 mois), pour la Podocine. Nous observons des niveaux similaires de signal pour les bandes situées à 90 kDa, et une augmentation des niveaux des signaux chez les rats diabétiques et les rats âgés par rapport aux jeunes rats contrôles, pour les bandes situées à 45kDa. Chaque groupe possède six échantillons (40 µg de concentration protéique) obtenus de trois rats différents (deux échantillons par rat).



Discussion

Discussion :**Le modèle animal:**

Nous avons utilisé pour l'étude de la Néphrine et de la Podocine, un modèle in vivo que nous avons évalué dans un environnement physiologique, sous des conditions normales et diabétiques. Cela nous a permis d'analyser de façon comparative les fentes de filtration et les protéines qui les composent. Le recours à un modèle in vivo a empêché d'une part l'apparition de faux positifs et de faux négatifs liés à la manipulation du milieu de culture, et il a exclu d'autre part, les défauts de signalisations entre les cellules qui peuvent surgir lors de l'utilisation d'un modèle in vitro.

Le rat est un modèle simple à manipuler et à maintenir. Dans le cadre de notre recherche, les rats utilisés (Sprague-Dawley) sont nés sous des paramètres physiologiques normaux, c'est à dire sans aucune maladie métabolique, avec une pression artérielle normale, une glycémie normale, et une capacité motrice normale. Nous leur avons causé des lésions diabétiques en leur administrant un produit cytotoxique, la streptozotocine, qui détruit les cellules bêta du pancréas. L'hyperglycémie a donc été induite par une déficience d'insuline. **(62 et 63)**. Ces animaux sont demeurés à partir du moment où la drogue leur est administrée, hyperglycémiques, hypoinsulinémiques et protéinuriques **(62 et 63)**. Il importe toutefois de préciser que la destruction de leurs cellules n'a pas été complète. Le nombre de cellules restantes a assuré la survie de l'animal à long terme qui est toutefois demeuré diabétique pour le reste de sa vie.

Il existe d'autres modèles de rats diabétiques, notamment les rats Wistar BB, les rats diabétiques par pancréatectomie, ou même les rats diabétiques par administration d'alloxane.

Les premiers sont des rats modifiés génétiquement qui deviennent spontanément diabétiques dû à une réaction auto-immunitaire dirigée vers les cellules bêta du pancréas (64 et 65). Les deux premiers modèles ci-haut mentionnés présentent comme inconvénient une destruction trop importante des cellules bêta. Sans l'administration de traitement, cette destruction cause la mort des rats utilisés. Ces modèles ne sont donc pas viables pour l'étude de la néphropathie diabétique à long terme. Finalement, le modèle de rats injectés à l'alloxane est semblable au modèle des rats injectés à la streptozotocine que nous avons utilisé. Cependant, l'administration d'alloxane étant plus toxique, les rats de ce modèle possèdent un taux plus élevé de mortalité, et requièrent une surveillance plus étroite (66).

Avant sacrifice, nous avons mesuré le poids et le taux de glycémie des animaux des différents groupes étudiés. Chez les rats jeunes et âgés ayant reçus les doses de streptozotocine, les résultats ont montré un état hyperglycémique, absent chez les rats des groupes contrôles. Les rats diabétiques présentaient en outre des symptômes reliés à leur pathologie, tels que la protéinurie et la glycosurie.

L'évaluation des tissus obtenus:

Suite à la détermination des niveaux de glucose pour chaque rat des différents groupes, nous avons vérifié la présence de Néphrine et de Podocine dans les pédicelles à l'aide de la technique de marquage en immunocytochimie combinée à celle de l'IgG-or pour la microscopie électronique. Contrairement aux techniques de microscopie optique ou à fluorescence, cette façon de faire permet l'observation du marquage (67 et 68) avec une très haute résolution. Contexte essentielle à l'étude des différentes structures du glomérule, et aux études morphométriques quantitatives requises par après. En effet, l'observation du tissu rénal

en microscopie électronique rend possible d'une part la différenciation des composants du glomérule, soit l'endothélium, la membrane basale, et les podocytes; et nous permet d'autre part, de mieux discerner les trois régions des pédicelles des podocytes, c'est à dire la membrane à la base, la membrane luminale, et les fentes de filtration.

De par nos recherches, nous avons observé un épaissement de la membrane basale chez les rats diabétiques de douze mois. Cet épaissement ne s'est pas présenté chez les rats diabétiques de trois mois. Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de fusion des pédicelles, ni de changement morphologique chez les rats diabétiques au niveau des podocytes.

Pour l'analyse des tissus, nous les avons tout d'abord enrobés à l'Épon, dans la mesure où cette résine assure une meilleure observation des différentes structures du glomérule. Or, les résultats obtenus par les anticorps utilisés sur ces tissus pour la détection d'antigène, n'ont révélé qu'un faible marquage des protéines. Nous avons donc décidé d'utiliser des tissus enrobés au Lowicryl K4M. Cette technique d'enrobage fournit une meilleure appréciation des antigènes, reconnus plus efficacement par les anticorps utilisés. Elle procure de plus, une très haute résolution pour les mesures, les analyses, et les comparaisons morphométriques entre les tissus contrôles et les tissus diabétiques.

La membrane basale:

Le glomérule est affecté dans le diabète par plusieurs altérations, dont l'épaississement de la membrane basale (69, 70 et 71), qui est due à la glycation du collagène et à une diminution de la dégradation de ce dernier (40). Ainsi, la protéinurie qui se présente avec le diabète serait le résultat de ces mêmes altérations au niveau de la membrane basale. Or, il a été démontré que ces dernières n'apparaissent que quelques mois après la manifestation des lésions du diabète

et de la protéinurie (73), ce qui indique qu'elles ne seraient donc pas nécessaires pour qu'il y ait une protéinurie. Par conséquent, le passage de l'albumine glyquée à l'urine, qui caractérise notamment la protéinurie et la glycosurie, ne peut être expliqué par les altérations structurelles au niveau de la membrane basale. Une des hypothèse avancée afin d'expliquer ce phénomène énonce que l'albumine glyquée agirait alors au niveau de la barrière formée par l'héparan sulfate en annulant sa charge anionique. (73).

Par ailleurs, il a été prouvé que d'autres éléments, outre ceux mentionnés ci-haut, qui participent à la filtration glomérulaire, peuvent aussi être responsables de la néphropathie. En effet, le syndrome néphrotique congénital de type finlandais (CNF) (74) et la forme récessive autosomique de glomérulosclérose segmentaire focale familiale (SRN1) (74) sont dues respectivement à une mutation de NPSH1 et de NPSH2. Dans les deux cas, la protéinurie est causée par des altérations au niveau des fentes de filtration sans qu'il y ait une implication apparente de la membrane basale.

Bien que le rôle de la membrane basale dans la filtration glomérulaire soit indiscutable, la fente de filtration et les protéines qui en font partie participent également à cette filtration. (74). Ces dernières sont donc toutes aussi importantes dans la néphropathie diabétique. L'apparition de la protéinurie peut être ainsi le résultat de l'altération des concentrations de ces protéines.

La visualisation de la fente de filtration en immunocytochimie:

La néphropathie diabétique constitue une des complications de l'hyperglycémie causées par le diabète. Elle se caractérise comme nous l'avons vu par une protéinurie qui indique une altération de la fonction glomérulaire.

Comme nous l'avons précisé plus haut, les études étaient orientées initialement vers la membrane basale du glomérule compte tenu de son épaissement dans le diabète. Ce n'est que tout récemment que plusieurs laboratoires se sont intéressés aux podocytes et aux altérations qu'ils subissent.

Dans la présente étude, nous avons tenté de déterminer - en tenant compte que le diabète et le vieillissement s'accompagnent tous deux d'une protéinurie - si la protéinurie était liée dans ces deux cas à des altérations dans l'expression de la Néphrine et de la Podocine dans les fentes de filtration. En conséquence, nous avons d'abord analysé les différentes concentrations de Néphrine et de Podocine relevées dans les trois domaines de la membrane des pédicelles, chez les rats des quatre groupes utilisés. Afin d'assurer la spécificité de l'étude de ces deux protéines, nous avons analysé le marquage de celles-ci dans la membrane basale et dans l'endothélium. Nous n'y avons observé aucun marquage significatif.

Nous avons par la suite réalisé des analyses morphométriques pour établir plus précisément la distribution de ces protéines sur la membrane des pédicelles. Dès lors, nous avons constaté chez les quatre groupes que le marquage immunocytochimique de la Podocine et de la Néphrine se concentrait dans les fentes de filtration. Nous avons mené enfin une étude comparative de ce marquage entre les différents rats des groupes jeunes et âgés.

En ce qui a trait à la Podocine, bien qu'elle se concentre dans les fentes de filtration avec un même patron de distribution chez les rats des quatre groupes, les valeurs absolues du marquage diminuent avec l'apparition du diabète et du vieillissement.

Pour ce qui est de la Néphrine, nous avons également relevé comme pour la Podocine, une diminution des valeurs absolues du marquage avec le diabète et le vieillissement. L'analyse du marquage montre en outre une concentration dans les fentes de filtration pour les deux anticorps utilisés (intracellulaire et extracellulaire) et ce, chez les rats des quatre groupes. Néanmoins, un changement du patron de distribution a été observé chez les rats diabétiques.

En effet, bien que la concentration de la Néphrine chez ces derniers soit inférieure à celle identifiée chez les rats contrôles sur les trois domaines, nous avons constaté, lors de l'utilisation de l'anticorps dirigé à la partie N-terminale, une augmentation du pourcentage de la distribution du marquage sur la membrane luminale. En revanche, avec l'anticorps dirigé à la partie C-terminale, nous avons noté une augmentation du pourcentage du marquage sur la membrane à la base. Cette différence de distribution pourrait être due au clivage de la protéine à l'extérieur du pédicelle. Ce clivage permet en effet une distribution différente des deux parties de la protéine au niveau de la membrane.

Les résultats ci-haut mentionnés viennent confirmer ceux obtenus par d'autres études similaires. (75, 76 et 79). De plus, compte tenu de la diminution des deux protéines dans les pédicelles chez les rats diabétiques et chez les rats âgés du groupe contrôle qui souffrent tous deux de protéinurie, certaines études ont montré l'existence d'un lien entre la diminution de l'expression de ces protéines et la présence de protéinurie. (78 et 79). Par ailleurs, la diminution de ces mêmes protéines a aussi été observée dans les néphropathies liées à d'autres pathologies déjà citées (80 et 81) qui ne présentent aucune altération au niveau de la membrane basale. Ainsi, à l'instar des recherches menées par différents groupes (40 et 83), nous pouvons avancer que la néphropathie diabétique est due non seulement aux altérations de la membrane basale, mais aussi en partie à la diminution des niveaux de Néphrine et de Podocine dans les fentes de filtration.

Évaluation des niveaux de Néphrine et de Podocine par immunobuvardage:

Nous avons réalisé des immunobuvardages d'échantillons issus des différents groupes de rats afin de confirmer les variations du marquage observées en immunocytochimie. Par la suite,

nous avons procédé à des mesures densitométriques pour chaque bande obtenue de ces immunobuvardages afin de quantifier les résultats. En tenant compte que la Néphrine et la Podocine ne sont produites que par les cellules épithéliales des glomérules, elles ne sont que faiblement synthétisées dans le rein. Par conséquent, nous avons dû isoler les glomérules de manière à bien réaliser nos études. Cette façon de procéder, nous a permis d'obtenir des signaux plus précis et plus prononcés de la concentration protéique des homogénats provenant des jeunes rats des groupes diabétique et contrôle, ainsi que des rats de 12 mois du groupe contrôle.

En premier lieu, nous avons analysé pour chacun de ces groupes la bande obtenue par immunobuvardage correspondant à la masse moléculaire de la Néphrine, soit 180 kDa. L'étude de ces trois bandes, affichant aucune variation significative entre les groupes, allait à l'encontre des résultats obtenus en immunocytochimie qui eux, affichaient une diminution du marquage de la Néphrine sur la membrane des pédicelles chez les rats diabétiques et âgés.

Par la suite, la deuxième bande observée sur la membrane de nitrocellulose incubée avec l'anticorps anti-Néphrine, se situait à 90kDa. Compte tenu de sa masse moléculaire, nous croyons que cette bande représenterait en fait un produit de la dégradation de la Néphrine. En outre, les niveaux du signal émis par la bande correspondante à chacun des groupes variaient de façon significative. En effet, nous avons observé une augmentation du signal chez les rats diabétiques de trois mois et chez les rats contrôles de douze mois, par rapport à celui obtenu chez les rats contrôles de trois mois. À la lumière de ces résultats, nous pouvons supposer qu'une telle augmentation serait également observable chez les rats diabétiques âgés.

Ainsi, si d'une part la bande à 90kDa représente de fait un produit de la dégradation de la Néphrine, et compte tenu d'autre part, que le signal qu'elle émet augmente avec le diabète et le vieillissement; nous pouvons penser que la dégradation augmenterait dans ces conditions. Cela amènerait par conséquent les podocytes à accroître la production de Néphrine de façon à

maintenir les niveaux de cette dernière plus ou moins constants, et ainsi compenser l'augmentation de la dégradation. Bien que cela pourrait expliquer l'absence de variation de signal à 180 kDa chez les différents groupes de rats (82), cela n'explique cependant pas les différences obtenues entre les résultats en morphométrie et ceux obtenus en densitométrie.

Premièrement, la technique d'immunocytochimie nous a permis de visualiser et de localiser de façon plus précise la présence de Néphrine dans les tissus étudiés. En effet, nous avons pu grâce à cette méthode, discerner une diminution des niveaux de cette protéine dans les fentes de filtration chez les rats diabétiques âgés. Deuxièmement, la technique d'immunobuvardage combinée à la densitométrie a confirmé la présence de la protéine étudiée dans les homogénats de glomérule. Cependant, l'évaluation quantitative des changements d'expressions de la Néphrine n'ont pas montré la même diminution observée en immunocytochimie. En effet, cette technique permet uniquement de définir la quantité de la protéine, et non sa localisation. Ainsi, la différence entre les résultats obtenus par morphométrie et par densitométrie pourrait être expliquée par l'augmentation de la Néphrine dans le corps des podocytes qui répond à la diminution de la Néphrine sur la membrane des pédicelles. En effet, la protéine resterait emprisonnée dans la cellule (reticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi) sans pouvoir parvenir à la membrane cellulaire. Par conséquent, les niveaux de protéines peuvent rester constants dans l'homogénat, comme nous l'avons vu par l'immunobuvardage, en dépit la diminution du marquage au niveau des fentes de filtration obtenue par immunocytochimie.

Il a été démontré chez les humains, qu'en présence du syndrome néphrotique à changement minime, la proportion entre le marquage de la Néphrine au niveau cytoplasmique et celui au niveau des fentes de filtration, est plus élevée chez les patients affectés que chez les patients contrôles. (87) Nous croyons que cela pourrait être également le cas pour le diabète.

En ce qui a trait à la Podocine, la bande correspondant à sa masse moléculaire de 45 kDa montrait une augmentation du signal chez les rats diabétiques de trois mois et chez les rats contrôles de douze mois par rapport au signal obtenu chez les rats contrôles de trois mois. Ces résultats vont également à l'encontre des résultats obtenus en immunocytochimie.

Nous avons aussi observé une seconde bande qui correspondait à une masse moléculaire de 90 kDa, soit le double de celle de la protéine. Nous pensons que cette bande, de par sa masse, représenterait en fait la forme dimérisée de la protéine. Cette hypothèse a d'ailleurs déjà été suggérée par d'autres chercheurs **(85 et 86)**. Nous avançons en outre que la protéine se trouverait dimérisée au niveau de la fente de filtration afin d'y exercer sa fonction. Finalement, l'intensité de la bande des trois groupes étudiés ne présentait aucune différence significative.

Ainsi, compte tenu des résultats qui montrent une augmentation de la Podocine avec le diabète et le vieillissement sans pour autant afficher une variation des niveaux de celle-ci dans sa forme dimérisée; nous pouvons donc supposer dans ces conditions, qu'un fort pourcentage de la protéine perdrait la capacité de se dimériser. Le podocyte compenserait ainsi ce défaut en produisant davantage de Podocine, de façon à maintenir dans les fentes de filtration les niveaux de la forme dimérisée active de la protéine.

Il importe de préciser que la Podocine ne perd pas la capacité de se dimériser. Elle devient en fait avec le diabète et le vieillissement, incapable de conserver sa forme dimérisée. En effet, la Néphrine étant une protéine signalétique, elle se lie à la Podocine au niveau des fentes de filtration de façon à former un complexe qui stabilise la forme dimérisée de la Podocine **(85 et 86)**. Or, en l'absence de Néphrine dans les conditions étudiées, le complexe ne parvient pas à se former, ce qui engendre en dernière instance l'instabilité du dimère de Podocine.

En ce qui concerne les différences entre les résultats obtenus par la morphométrie et la

densitométrie, elles peuvent être expliquées par les limitations inhérentes à ces mêmes techniques. En effet, la technique d'immunocytochimie ne peut distinguer la forme dimérique de la protéine de sa forme monomérique. Par ailleurs, l'immunobuvardage ne permet pas de localiser les protéines dans le glomérule. Par conséquent, compte tenu que seule la forme dimérisée de la Podocine après avoir formée un complexe avec la Néphrine peut être observée dans les fentes de filtration, et compte tenu que le niveau de Néphrine est inférieur dans ces dernières avec le vieillissement et le diabète; la quantité de Podocine dimérisée sera aussi inférieure à ce niveau dans ces mêmes conditions. Ceci expliquerait la diminution du marquage de la Podocine dans les fentes de filtration des rats diabétiques et âgés obtenue par immunocytochimie.

Le signal à 45 kDa obtenu en immunobuvardage représente donc la Podocine non-dimérisée emprisonnée à l'intérieur de la cellule dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi.

Les résultats que nous avons présenté pourraient également être expliqués à la lumière des différentes études réalisées. En effet, il a été démontré que l'insuline agit sur les podocytes matures (86), en stimulant l'absorption de glucose par l'intermédiaire des transporteurs GLUT1 et GLUT4 (87). Il importe de souligner d'ailleurs, que seuls les podocytes dans le glomérule présentent ces transporteurs (26). Dans le diabète, l'augmentation des niveaux de glucose observée par certaines études indiquerait un défaut des transporteurs ci-haut mentionnés, qui causerait par ailleurs l'apparition d'AGE dans les podocytes (89 et 90). Ce phénomène entraînerait en dernière instance, la diminution de la relation entre la concentration d'actine fibrillaire et d'actine G dans la cellule, mais aussi, celle des alpha-actinine-4 (91 et 92). Ces altérations du cytosquelette pourraient donc être la cause du défaut de migration de la Néphrine et de la Podocine vers la membrane cellulaire. Ce qui expliquerait d'autant plus la diminution des niveaux de ces protéines dans les fentes de

filtration chez les rats diabétiques, comme nous l'avons observée dans le cadre de notre étude. Néanmoins, nous devons tenir compte du fait que la Néphrine et la Podocine peuvent en fait se retrouver dans le réticulum endoplasmique en raison des altérations au niveau des protéines mêmes, et non suite aux problèmes de transport par le cytosquelette. La diminution de Néphrine et de Podocine serait ainsi le résultat de l'interruption de la voie des ubiquitines.

En effet, il a été prouvé (92) que sous des conditions de traitements avec des substances telles que la tunicamycin, le A23187 ou le SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine) qui induisent une agression au niveau du réticulum endoplasmique; les podocytes en culture montrent une augmentation de la production de protéines de stress aussi appelées chaperons. Ces dernières aident ainsi les protéines produites dans le réticulum endoplasmique à être repliées correctement par la voie des ubiquitines. Cependant, sous des conditions d'hyperglycémie ou d'hypoxie les niveaux des chaperons n'augmentent pas. Par conséquent, et étant donné que sous ces conditions nous observons la présence d'AGE qui accroît le pourcentage des protéines mal pliées, et que la production de chaperons ne s'en trouve pas augmentée; il appert que les protéines défectueuses s'accumulent dans le réticulum endoplasmique.

Ainsi, compte tenu des niveaux élevés de glucose et d'AGE relevés dans les podocytes dans le diabète (88), nous pensons qu'il est possible que la Néphrine et la Podocine soient glyquées (93 et 94). Ce défaut, additionné au manque de production de chaperons, causerait l'accumulation de ces deux protéines dans le réticulum endoplasmique.

Bibliographie

1. Weinstein A. M. 1988. Modeling the proximal tubule: complications of the paracellular pathway; AJP - Renal Physiology, Vol 254, 297-F305
2. Gerok W. 1982, Functional properties of the paracellular pathway in some leaky epithelia.
Klin Wochenschr. 1; 60: 1191-1200
3. Nishimura H, Koseki C, Imai M, Braun EJ. 1989. Sodium chloride and water transport in the thin descending limb of Henle of the quail. Am J Physiol. 257: F994-1002
4. Zeidel ML. 1996. Low permeabilities of apical membranes of barrier epithelia: what makes watertight membranes watertight? Am J Physiol. 271: F243-5
5. Fawcett DW, 1986. reviewed edition of : A textbook of histology p. 740
6. Stoner LC. 1985, The movement of solutes and water across the vertebrate distal nephron; Ren Physiol. 8: 237-48.
7. Arakawa M. 1971. A scanning electron microscopy of the human glomerulus. Am. J. of Pathol. 64, 457-466
8. Yamada E. 1955. The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1,551-558

9. Farquhar MG, Wissig SL, Palade GE. 1961. Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *Journal of Experimental. Medicine.* 113, 47-66
10. Latta H. 1970. The glomerular capillary wall. *J. Ultrastruct. Res.* 4, 455
11. Rodewald R, Karnovsky MJ. 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm (heparan-sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 31, 185-188
12. Vasmant D, Maurice M, Feldmann G. 1984. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular permeability using catalase and peroxidase as tracer proteins. *Anat. Rec* 210, 17-24
13. Lachapelle M, Bendayan M. 1991. Contractile proteins in podocytes: Immunocytochemicallocalisation of actin and alpha-actinin in normal and nephrotic rat kidneys. *Virchow's Archive of Bio. Cellular Pathology. Incl. Mol. Pathol.* 60: 105-111
14. Capasso G, Evangelista C, Zacchia M, Trepiccione F, Acone D, Cantone A, Pollastro RM, Rizzo M. 2006. Acid-base transport in Henle's loop: the effects of reduced renal mass and diabetes. *J Nephrol.* 19 Suppl 9: S11-7.
15. Soleimani M. 2002. $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$ cotransporters (NBC): expression and regulation in the kidney. *J Nephrol.* 15 Suppl 5: S32-40

16. Quentin F, Eladari D, Frische S, Cambillau M, Nielsen S, Alper SL, Paillard M, Chambrey R. 2004. Regulation of the Cl-/HCO₃- exchanger AE2 in rat thick ascending limb of Henle's loop in response to changes in acid-base and sodium balance (AE2) *J Am Soc Nephrol*. 15: 2988-97
17. Wall SM. 2005. Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 14: 480-4.
18. Arendshorst WJ, Gottschalk CW. 1985. Glomerular ultrafiltration dynamics: Historical perspective. *Am. J. Physiol*. 248, F163-F174
19. Brenner BM, Troy JL., Daugharty TM. 1971. The dynamics of glomerular permselectivity: Insights derived from observations in vivo. *Kidney Int*. 12, 229-237
20. Deen WM, Bridges CR, Brenner BM, Myers BD. 1985. Heteroporous model of glomerular size selectivity: Application to normal and nephrotic humans. *Sep, Am. J. Physio*. 249, F374-F389
21. Ott CE, Marchand GR, Diaz-Buxo J, Knox FG. 1976. Determinants of glomerular filtration rate in the dog. *Am. J. Physiol*. 231, 235-239
22. Tonder KH, Aukland K. 1979. Glomerular capillary pressure in the rat. *May, Acta Physiol Scand* 106, 93-95

23. Brenner BM, Ichikawa I, Deen WM. 1981. Glomerular filtration. *The Kidney*, 2nd edition. 289-327
24. Eisenbach GM, Van Liew JB, Manz N, Muir P. 1975. Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: A micropuncture study. *Kidney Int.* 8, 80-87
25. Tucker BJ, Blantz RC. 1977. An analysis of the determinants of nephron filtration rate. *Am J. Physiol.* 232: F477-83.
26. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 83: 253-307
27. Mundel P, Kriz W. 1995. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl).* 192: 385-97
28. Hora K, Ohno S, Oguchi H, Furukawa T, Furuta S. 1990. Three-dimensional study of glomerular slit diaphragm by the quick-freezing and deep-etching replica method. *Eur J Cell Biol.* 53: 402-6.
29. Ohno S, Hora K, Furukawa T, Oguchi H. 1992. Ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in fresh unfixed kidneys by a quick-freezing method. *Virchow's Arch. B. Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 61: 351-8

30. Kestilä et al. 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1: 575-582.
31. Nathan DM. 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.* 328, 1676-1685
32. Benet PH. 1983. The diagnosis of diabetes: New internal classification and diagnostic criteria. *Ann. Rev. Med.* 34, 295-309
33. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK. 1992. The pathogenesis, prediction and prevention of insulin-dependant diabetes mellitus. *J. Clin. North Am.* 21, 199-219
34. Yki-Järvinen H. 1994. Pathogenesis of non-insulin-dependant diabetes mellitus. *Lancet* 343,91
35. Herf S, Pohl SL, Sturgill B, Bolton WK. 1979. An evaluation of diabetic and pseudodiabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Med.* 66, 1040-1045
36. Kimmelstiel P, Wilson C. 1936. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am. J. Pathol.* 13, 83-105
37. Dachs S, Churg J, Mautner W, Grishman E. 1964, Diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* 44, 155

38. Bendayan M. 1985. Alteration in the distribution of type IV collagen in glomerular basal lamina in diabetic rats as revealed by immunocytochemistry and morphometrical approach. *Diabetologia* 28, 373-378
39. Desjardins M, Bendayan M. 1990. Ultrastructure distribution of glomerular basement membrane components in experimental diabetes. *Diabetes Research* 14, 65-73
40. Boucher E, Mayer G, Londono I, Bendayan M. 2006. Expression and localization of MT1-MMP and furin in the glomerular wall of short- and long-term diabetic rats. *Kidney Int.* 69: 1570-7
41. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. 2005. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 54: 1626-34.
42. Makino H, Yamasaki Y, Haramoto T, Shikata K, Hironaka K, Ota Z, Kanwar YS. 1993. Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. *Lab Invest.* 68: 45-55.
43. Cohen MP. 1988. Nonenzymatic glycation: a central mechanism in diabetic microvasculopathy?
J Diabet Complications. 2: 214-7.
44. Cohen MP, Urdanivia E, Surma M, Ciborowski CJ. 1981. Nonenzymatic glycosylation of basement membranes: in vitro studies. *Diabetes.* 30: 367-71.

45. Raabe HM, Molsen H, Mlinaric SM, Acil Y, Sinnecker GH, Notbohm H, Kruse K, Muller PK. 1996. Biochemical alterations in collagen IV induced by in vitro glycation. *Biochem J*. 319 (Pt 3): 699-704.
46. Verbeke P, Perichon M, Borot-Laloi C, Schaefferbeke J, Bakala H. 1997. Accumulation of advanced glycation endproducts in the rat nephron: link with circulating AGEs during aging. *J Histochem Cytochem*. 45 : 1059-68.
47. Ziyadeh FN, Cohen MP. 1993. Effects of glycated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem*. 125: 19-25.
48. Cohen MP, Ziyadeh FN. 1996. Role of Amadori-modified nonenzymatically glycated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 7: 183-90.
49. Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN. 2000. Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int Suppl*. 77:S40-4.
50. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. 2003. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*. 112: 209-21.
51. Krentz AJ, Bailey CJ. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 65 : 385-411.
52. Bjorn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, Nyberg G, Walker JD, Viberti GC, Osterby R.

1995. Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 38, 1197-1204

53. Cohen AH, Mampaso F, Zamboni L. 1977. Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. An ultrastructural study. *Lab Invest.* 37, 30-42

54. Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, Wang W, Gorin Y, Barnes JL, Abboud HE. 2006. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 55 : 894-900.

55. Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, Ociepka R, Leitges M, Rinta-Valkama J, Holthofer H, Haller H. 2006. Nephron loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C α signaling in-vivo. *Kidney Int.* 70 : 1456-62.

56. Londono I, Bendayan M. 2005. Glomerular handling of native albumin in the presence of circulating modified albumins by the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289: F1201-9.

57. Spiro, R.G. 1967. Studies on the renal glomerular basement membrane. Preparation and chemical composition. *J. Biol. Chem.* 242; 1915-1922.

58. McLean I.W, Nakane P.K. 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1077-1083.

59. Kellenberger E. et al. 1980. Low denaturation embedding for electron microscopy of thin section. Chemeische Werke Lowi GmbH, pp. 1-59.
60. Bendayan et al. 1984. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: Methods, applications and limitations. J. Electron. Microsc. Tech. 1, 243-270.
61. Laemmli, U.K. 1970. Nature, 227, 680.
62. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. Proc Soc Exp Biol Med. 126: 201-5.
63. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J Clin Invest. 48: 2129-39.
64. Nakhooda, A. F, A. A. Like, C. I. Chappel, F. T. Murray, et E. B. Marliss. 1977. The spontaneously diabetic Wistar rat. Diabetes. 26: 100-12.
65. Seemayer, T. A, L. L. Oligny, G. S. Tannenbaum, H. Goldman, et E. Colic. 1980. Animal model: spontaneous diabetes mellitus in the BB Wistar rat. Am. J. Pathol. 101: 485-8.
66. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. 2004. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. Comp Med. 54: 252-7.

67. Bendayan M. 2000. A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. *Biotech Histochem.* 75: 203-42.
68. Horisberger M, Rosset J. 1977. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 25: 295-305.
69. Carlson EC, Vari RC, Audette JL, Finke MA, Ressler MJ. 2004. Significant glomerular basement membrane thickening in hyperglycemic and normoglycemic diabetic-prone BB Wistar rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 281: 1308-18.
70. Phillips AO, Baboolal K, Riley S, Gronc H, Janssen U, Steadman R, Williams J, Floege J. 2001. Association of prolonged hyperglycemia with glomerular hypertrophy and renal basement membrane thickening in the Goto Kakizaki model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Kidney Dis.* 37: 400-10.
71. Sternberg M, Cohen-Forterre L, Peyroux J. 1985. Connective tissue in diabetes mellitus: biochemical alterations of the intercellular matrix with special reference to proteoglycans, collagens and basement membranes. *Diabete Metab.* 11: 27-50.
72. Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE. 1997. Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes.* 46: 473-80.

73. Doucet M, Londono I, Gomez-Pascual A, Bendayan M. 2000. Glomerular basement membrane selective permeability in short-term streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Diabetes Res.* 1: 19-30
74. Koziell A, Grech V, Hussain S, Lee G, Lenkkeri U, Tryggvason K, Scambler P. 2002. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet.* Feb 15; 11: 379-88.
75. Patari-Sampo A, Ihalmio P, Holthofer H. 2006. Molecular basis of the glomerular filtration: Nephrin and the emerging protein complex at the podocyte slit diaphragm. *Ann Med.* 38: 483-92.
76. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. 2006. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton).* 11: 274-81.
77. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. 1999. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7962-7.
78. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. 2006. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton).* 11: 274-81.
79. Tryggvason K, Wartiovaara J. 2001. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10: 543-9.

80. Meyrier A. 2005. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol.* 1: 44-54.
81. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA. 2003. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol.* 14: 2063-71.
82. Goldspink DF, Garlick PJ, McNurlan MA. 1983. Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory prgrowth and subsequent denervation atrophy. *Biochem J.* 15; 210: 89-98
83. Sung SH, Ziyadeh FN, Wang A, Pyagay PE, Kanwar YS, Chen S. 2006. Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. 2006. *J Am Soc Nephrol.* 17: 3093-104.
84. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E, Saleem MA, Walz G, Benzing T. 2003. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet.* 12: 3397-405.
85. Huber TB, Benzing T. 2005. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14: 211-6.

86. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. 2001. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem.* 276: 41543-6.
87. Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K, Soderberg M. 2003. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 18: 70-6.
88. Coward RJ, Welsh GI, Yang J, Tasman C, Lennon R, Koziell A, Satchell S, Holman GD, Kerjaschki D, Tavaré JM, Mathieson PW, Saleem MA. 2005. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes.* 54: 3095-102.
89. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G. 2003. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes.* 52: 1023-30.
90. Ziyadeh FN, Cohen MP, Guo J, Jin Y. 1997. RAGE mRNA expression in the diabetic mouse kidney. *Mol Cell Biochem.* 170 : 147-52.
91. Ha TS. 2006. High glucose and advanced glycosylated end-products affect the expression of alpha-actinin-4 in glomerular epithelial cells. *Nephrology (Carlton).* 11: 435-41.
92. Dai T, Natarajan R, Nast CC, LaPage J, Chuang P, Sim J, Tong L, Chamberlin M, Wang S, Adler SG. 2006. Glucose and diabetes: effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. *Kidney Int.* 69: 806-14.

93. Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, Shea E, Hud EA, Lautenslager GT, Shearman CW. 2005. Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 68 : 1554-61.
94. Inagi R, Nangaku M, Onogi H, Ueyama H, Kitao Y, Nakazato K, Ogawa S, Kurokawa K, Couser WG, Miyata T. 2005. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int.* 68: 2639-50.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abords remercier ma famille et ma femme pour m'avoir encouragé pendant toute cette période. Merci, Jessica, Natalia, Papa et Maman, sans vous je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.

De plus je voudrais aussi remercier, mes collègues de laboratoire, soit Philippe, Diane, Irène et biensûr le Dr Bendayan pour toute l'aide et les conseils qu'ils m'ont offert durant toute ma maîtrise.

Merci beaucoup.